|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **分类号：R557+.4** |  | **学校代码： 10392** |
| **学科专业代码：100201**  **密 级 ：** | **学** | **号：1121003018** |



**博士学位论文**



**急性淋巴细胞性白血病细胞株中 T-型钙通道和钠通道的表达与功能**

**Identification and Functional Characterization of T-type Calcium Channels and Sodium Channels in Acute Lymphocytic Leukemia Cell Lines**

|  |  |
| --- | --- |
| **学** 位 类 型 **：** | **医学博士** |
| **所** 在 学 院 **：** | **协和临床医学院** |
| **申** 请 人 姓 名 **：** | **黄伟锋** |
| **学** 科 、 专 业 **：** | **内科学（血液）** |
| **导** **师：** | **陈元仲** **教授** |
| **研 究 起 止 日 期 ：** | **2013 年03 月至2014 年12 月** |
| **答 辩 委 员 会 主 席 ：** | **陈志哲** **教授** |
| **答** 辩 日 期 **：** | **2015 年06 月04 日** |

**二○一五年六月**



目 录

[摘要](#_Toc686310945) 5

**[Abstract](#_Toc686310946)** 5

[第一章](#_Toc686310947) **[T-](#_Toc686310947)**[型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的表达与功能研究](#_Toc686310947) 5

[前言](#_Toc686310948) 6

**[1](#_Toc686310949)** [实验材料和方法](#_Toc686310949) 6

**[1.1](#_Toc686310950)** [材料](#_Toc686310950) 6

**[1.1.1](#_Toc686310951)** [标本和细胞株](#_Toc686310951) 6

**[1.1.2](#_Toc686310952)** [主要仪器及产地](#_Toc686310952) 6

**[1.1.3](#_Toc686310953)** [主要试剂及生产厂商](#_Toc686310953) 7

**[1.1.4](#_Toc686310954)** [主要耗材及生产厂家](#_Toc686310954) 8

**[1.1.5](#_Toc686310955)** [溶液的配置细胞冻存液：](#_Toc686310955) 9

[1 mol/L Tris·HCl (pH7.5) 10 ml](#_Toc686310956) 10

**[1.2.1](#_Toc686310957)** [细胞培养、复苏及冻存](#_Toc686310957) 11

**[1.2.2](#_Toc686310958)** [外周血单个核细胞分离](#_Toc686310958) 11

**[1.2.3 RT-PCR](#_Toc686310959)** [和实时定量](#_Toc686310959)**[PCR](#_Toc686310959)** 11

**[1.2.5](#_Toc686310960)** [免疫荧光](#_Toc686310960) 16

**[1.2.6](#_Toc686310961)** [电生理记录](#_Toc686310961) 16

[1.2 Na2ATP, 0.5 Na3GTP, 1.2 Creatine phosphase, 用CsOH调整pH值为7.2。在记录钙电流(钡电流)时，采用传统的全细胞膜片钳记录技术，所用设备为Axopatch 200B放大器和Digidata 1320A数模/模数转化器(Axon Instruments, CA, USA) 。采样频率为5](#_Toc686310962) 16

**[1.2.7](#_Toc686310963)** [细胞增殖实验](#_Toc686310963) 16

**[1.2.8 T-](#_Toc686310964)**[型钙通道](#_Toc686310964)**[α1G](#_Toc686310964)**[和](#_Toc686310964)**[α1H](#_Toc686310964)**[基因的敲除](#_Toc686310964) 16

**[1.2.9](#_Toc686310965)** [细胞周期分析](#_Toc686310965) 19

**[1.2.10](#_Toc686310966)** [细胞凋亡检测](#_Toc686310966) 19

**[1.2.11](#_Toc686310967)** [胞内游离钙的测量](#_Toc686310967) 20

**[1.2.12](#_Toc686310968)** [线粒体膜电位测定](#_Toc686310968) 20

**[1.2.13](#_Toc686310969)** [统计分析](#_Toc686310969) 20

**[2](#_Toc686310970)** [结果](#_Toc686310970) 20

**[2.1](#_Toc686310971)****[T-](#_Toc686310971)**[钙通道在人类白血病细胞株和人外周血单个核细胞的表达](#_Toc686310971) 20

**[2.2](#_Toc686310972)****[T-](#_Toc686310972)**[型钙通道拮抗剂抑制人急性淋巴细胞性白血病细胞的活力](#_Toc686310972) 22

**[2.3](#_Toc686310973)** [米贝拉地尔和](#_Toc686310973)**[NNC-55-0396](#_Toc686310973)**[通过细胞周期阻滞和细胞凋亡两种途径抑制急性淋巴细胞性白血病细胞的生长](#_Toc686310973) 22

**[2.4](#_Toc686310974)** [米贝拉地尔和](#_Toc686310974)**[NNC-55-0396](#_Toc686310974)**[下调](#_Toc686310974)**[MOLT-4](#_Toc686310974)**[细胞的](#_Toc686310974)**[ERK](#_Toc686310974)**[信号通路](#_Toc686310974) 22

**[2.5](#_Toc686310975)****[NNC-55-0396](#_Toc686310975)** [诱发内质网钙释放](#_Toc686310975) 23

**[3](#_Toc686310976)** [讨论](#_Toc686310976) 24

[第二章 电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的表达与功能研究](#_Toc686310977) 24

[前言](#_Toc686310978) 24

**[1](#_Toc686310979)** [实验材料和方法](#_Toc686310979) 25

**[1.1](#_Toc686310980)** [材料](#_Toc686310980) 25

**[1.1.1](#_Toc686310981)** [标本和细胞株](#_Toc686310981) 25

**[1.1.2](#_Toc686310982)** [主要仪器及产地](#_Toc686310982) 25

**[1.1.3](#_Toc686310983)** [主要试剂及生产厂商](#_Toc686310983) 25

**[1.1.4](#_Toc686310984)** [主要耗材及生产厂家](#_Toc686310984) 26

**[1.1.5](#_Toc686310985)** [溶液的配置细胞冻存液：](#_Toc686310985) 27

[1 mol/L Tris·HCl (pH7.5) 10 ml](#_Toc686310986) 28

**[1.2](#_Toc686310987)** [方法](#_Toc686310987) 29

**[1.2.1](#_Toc686310988)** [细胞培养、复苏及冻存](#_Toc686310988) 29

[1.2.2 外周血单个核细胞分离方法同第一部分1.2.2。](#_Toc686310989) 30

**[1.2.3](#_Toc686310990)****[RT-PCR](#_Toc686310990)** [和实时定量](#_Toc686310990)**[PCR](#_Toc686310990)** 30

**[1.2.4](#_Toc686310991)****[Western Blot](#_Toc686310991)** 32

**[1.2.5](#_Toc686310992)** [免疫荧光](#_Toc686310992) 33

**[1.2.6](#_Toc686310993)** [电生理记录](#_Toc686310993) 33

**[1.2.7](#_Toc686310994)** [细胞增殖实验](#_Toc686310994) 33

**[1.2.8](#_Toc686310995)****[Transwell](#_Toc686310995)** [实验](#_Toc686310995) 33

**[1.2.9](#_Toc686310996)** [统计分析](#_Toc686310996) 34

**[2](#_Toc686310997)** [结果](#_Toc686310997) 34

**[2.1](#_Toc686310998)** [急性淋巴细胞性白血病细胞和人外周血单个核细胞电压门控钠通道的分子特征](#_Toc686310998) 34

**[2.2](#_Toc686310999)** [电压门控钠通道的电生理学特征](#_Toc686310999) 34

**[2.3](#_Toc686311000)** [电压门控钠通道在淋巴细胞增殖、迁移和侵袭中的作用](#_Toc686311000) 34

[2.4 A，2.4B)。然而，TTX 可以显著抑制MOLT-4 和Jurkat 细胞的侵袭能力，2µM TTX](#_Toc686311001) 34

**[3](#_Toc686311002)** [讨论](#_Toc686311002) 34

[结论](#_Toc686311003) 35

[1. 急性淋巴细胞性白血病细胞表达T-型钙通道，而正常人外周血单个核细胞不表达T-](#_Toc686311004) 35

[参考文献](#_Toc686311005) 35

[参考文献](#_Toc686311006) 38

[参考文献](#_Toc686311007) 40

**英文缩略语 表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ALL | Acute lymphocytic leukemia | 急性淋巴细胞性白血病 |
| ER | Endoplasmic reticulum | 内质网 |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cell | 外周血单个核细胞 |
| PI | Propidium iodide | 碘化丙啶 |
| PERK | RNA-like ER kinase | RNA-like ER 激酶 |
| UPR | Unfolded Protein Response | 非折叠蛋白反应 |
| TG | Thapsigargin | 毒胡萝卜素 |
| CsA | Cyclosporine A | 环孢素A |
| VGCC | Voltage-gated calcium channel | 电压门控钙通道 |
| VGSC | Voltage-gated sodium channel | 电压门控钠通道 |
| KV1.3 | Voltage-gated potassium channel | 电压门控钾通道 |
| KCa | Calcium-activated potassium channel | 钙激活钾通道 |
| CRAC Calcium release-activated calcium channel 钙释放激活钙通道 | | |
| Clswell | Swelling-activated chloride channel | 肿胀激活氯通道 |
| ERK | Extracellular regulated protein kinases | 细胞外信号调节蛋白激酶 |
| TTX | Tetrodotoxin | 河豚毒素 |

**急性淋巴细胞性白血病细胞株中T-型钙通道和钠通道的表达与功能**

摘**要**

**背景：**T-型钙通道在人类多种类型癌细胞中异常表达，并参与细胞周期、细胞增殖和细胞死亡的调节。应用T-型钙通道阻断剂可以显著抑制高表达T-型钙通道肿瘤的细胞增殖并诱导细胞凋亡。越来越多的数据表明肿瘤细胞的迁移受电压门控钠通道的调控，电压门控钠通道特异性阻断剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)能够在体外系统抑制多种与迁移相关的细胞行为。有意思的是，有学者已经把淋巴细胞的运输与肿瘤细胞的迁移进行了比较，认为这两种行为具有非常相似的特征。研究发现淋巴细胞有多种离子通道的表达，包括电压门控钾通道(KV1.3)、钙激活钾通道(KCa)、钙释放激活钙通道(CRAC)、肿胀激活氯通道(Clswell)。而T-型钙通道和电压门控钠通道在正常淋巴细胞和急性淋巴细胞性白血病细胞的表达及功能目前尚不清楚。本课题拟研究T-型钙通道及电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞和正常淋巴细胞中的表达，并对其功能进行研究。**方法：**运用RT-PCR、Q-PCR、western blotting、免疫荧光和全细胞膜片钳技术研究T-型钙通道及电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞和正常淋巴细胞中的表达。利用细胞增殖实验和siRNA技术观察T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞生长中的作用。细胞周期和细胞凋亡实验观察T-型钙通道阻断剂对细胞周期和凋亡的影响。流式细胞技术观察T-型钙通道阻断剂对胞内钙稳态和内质网钙库释放的影响。线粒体膜电位测定观察T-型钙通道阻断剂对线粒体膜电位的影响及内质网-线粒体钙流动在线粒体膜电位去极化中的作用。Western blotting技术探讨T-型钙通道阻断剂对ERK信号通道的影响。利用细胞侵袭实验研究电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞迁移中的作用。

**结果：**（1）T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞中有表达，而正常外周血淋巴细胞不表达。（2）T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞增殖中发挥重要的作用。（3）T-型钙通道阻断剂-米贝拉地尔(mibefradil)和NNC-55-0396浓度依赖性地抑制急性淋巴细胞性白血病细胞的生长。T-型钙通道阻断剂对细胞的生长具有双重影响：（i） 抑制细胞增

殖，通过阻断G1-S期转折；(ii)诱导细胞凋亡。（4）T-型钙通道阻断剂破坏急性淋巴细胞性白血病细胞胞内的钙稳态并诱导内质网钙释放，与细胞凋亡密切相关。（5）T-型钙通道阻断剂- NNC-55-0396可以引起急性淋巴细胞性白血病细胞线粒体膜电位去极化，而内质网-线粒体钙流动没有直接参与线粒体膜电位的去极化。（6）米贝拉地尔和NNC-55-0396能够抑制MOLT-4细胞的ERK1/2磷酸化。（7）电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞和正常外周血淋巴细胞都有表达，且表达亚型以TTX-敏感性钠通道为主。（8）电压门控钠通道特异性阻断剂TTX抑制急性淋巴细胞性白血病细胞的侵袭能力。

**结论：**（1）T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞增殖中发挥重要的作用。（2）米贝拉地尔和NNC-55-0396在表达T-型钙通道的急性淋巴细胞性白血病细胞中具有抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用，这将为白血病的治疗带来新的靶点。（3）电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的侵袭中发挥着重要的作用。

**关键词：T-型钙通道； 电压门控钠通道； 白血病； 淋巴细胞**

**Identification and Functional Characterization of T-type Calcium Channels and Sodium Channels in Acute Lymphocytic Leukemia Cell Lines**

**Abstract**

**Background:** T-type Ca2+ channels are often aberrantly expressed in different human cancers and participate in the regulation of cell cycle progression, proliferation and death. T-type Ca2+ channel antagonists significantly inhibited cell proliferation and induced cell apoptosis of tumors with high expression T-type Ca2+ channels. There is increasing evidence suggest that cancer metastasis is controlled by voltage-gated sodium channel (VGSC) activity. Accordingly, the specific VGSC blocker TTX (tetrodotoxin) suppresses a variety of metastatic cell behaviors *in vitro*. Interestingly, parallels have been drawn between lymphocyte trafficking and cancer metastasis. A variety of ion channels has been discovered in lymphocytes, including voltage-gated potassium channels (KV1.3), calcium-activated potassium channels (KCa), calcium release-activated calcium channels (CRAC), and swelling-activated chloride channels (Clswell).

However, there is no report about the expression and functional roles of T-type Ca2+ channels

And VGSCs in normal lymphocytes and acute lymphocytic leukemia (ALL) cells. The aim of the study is to claim the expression and functions of T-type Ca2+ channels and VGSCs in ALL cell lines and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

**Methods:** RT-PCR, Q-PCR, western blotting, immunofluorescence and whole-cell patch-clamp recording were employed to assess the expression of T-type Ca2+ channels and VGSCs in ALL cell lines and human PBMCs. Cell growth assay and siRNA were used to exploire the function of T-type Ca2+ channels in cell growth of ALL cell lines. We used cell cycle and cell apoptosis assay to detect the effect of T-type Ca2+ channel antagonists on cell cycle and cell apoptosis. The

Flow cytometric calcium flux assay was employed to test the effect of T-type Ca2+ channel

Antagonists on intercellular Ca2+ homeostasis and ER (endocytoplasmic reticulum) Ca2+ release.

Mitochondrial membrane potential assay was used to assess the effect of T-type Ca2+ channel antagonists on mitochondrial membrane potential and the role of ER-mitochondrial Ca2+ flux in the depolarization of mitochondrial membrane potential. In addition, we used western blotting technique to detect the effect of T-type Ca2+ channel antagonists on ERK signaling pathway. Cell invasion assay was used to explore the role of VGSCs in ALL cell's invasion.

**Results:** (1) ALL cell lines expressed T-type Ca2+ channels, while human PBMCs did not express T-type Ca2+ channels. (2) T-type Ca2+ channels played an important role in cell proliferation of ALL cell lines. (3) We show that ALL cell lines exhibited reduced cell growth when treated with T-type Ca2+ channel inhibitors, mibefradil and NNC-55-0396 in a concentration-dependent manner. Mechanistically, these inhibitors played a dual role on cell viability: (i) blunting proliferation, through a halt in the progression to the G1-S phase; and (ii) promoting cell apoptosis. (4) T-type Ca2+ channel inhibitors disrupted intercellular Ca2+ homeostasis and induced ER Ca2+ release, which played an important role in cell apoptosis. (5)

T- type Ca2+ channel inhibitor - NNC-55-0396 depolarized mitochondrial membrane potential of

ALL cell lines, and the effect of NNC-55-0396 on depolarization of the mitochondrial membrane potential may not directly depend on ER-mitochondrial Ca2+ flux. (6) We observed a reduced phosphorylation of ERK1/2 in MOLT-4 cells in response to mibefradil and NNC-55-0396 treatment. (7) ALL cell lines and human PBMCs expressed VGSCs, and the main subunits of VGSCs were TTX-sensitive VGSCs. (8) TTX decreased the invasion of Jurkat and MOLT-4 cells ~90%.

**Conclusions:** (1) T-type Ca2+ channels played an important role in cell proliferation of ALL cell lines. (2) These results indicate that mibefradil and NNC-55-0396 regulate proliferation and apoptosis in T-type Ca2+ channel expressing ALL cells and suggest a potential therapeutic target for leukemia. (3) The results indicate that the activity of VGSCs could represent a novel mechanism potentiating the invasive capacity of ALL cells.

**Keywords:** T-type calcium channels; Voltage-gated sodium channels; Leukemia; Lymphocytes

# **第一章** **T-**型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的表达与功能研究

前**言**

在全世界范围内，白血病是儿童中最常见的恶性肿瘤。在白血病的主要分型中，急性淋巴细胞性白血病大约占到儿童所有肿瘤的30% [1]。尽管大部分急性淋巴细胞性白血病在儿童中是可以治愈的，但是占到急性淋巴细胞性白血病10-15%的急性T淋巴细胞性白血病，预后很差，在进行有效治疗的前提下，5年无病生存率只有60-75% [2]。众所周知，急性淋巴细胞性白血病是起源于T型或B型细胞谱系的恶性血液病，然而，其发病机制目前尚不清楚。

钙离子是胞内一种重要的第二信使，它参与许多细胞生物学行为的调节，譬如细胞周期进程、细胞增殖和细胞凋亡[3, 4]。胞内游离钙离子浓度受到多种机制的调控，如细胞膜上的离子通道（包括电压门控和配体门控离子通道）、离子交换体、离子泵、以及胞内钙库的释放。胞内的钙震荡信号在细胞周期进程和增殖过程中发挥着重要的作用[5]，然而，钙超载和钙失控会导致细胞死亡[6]。在正常的上皮细胞，胞内游离钙离子是细胞进入和完成S期和M期的必要因素。然而，癌细胞与正常细胞相比，只需要很低的胞外钙浓度就可以完成这些细胞周期进程[7]，表明癌细胞可以通过其他更有效的途径引起钙内流来满足细胞增殖对钙离子的需求。

T-型钙通道在多种类型的肿瘤细胞中表达，并参与肿瘤细胞的增殖和凋亡，如白血病[8]、卵巢癌[9, 10]、神经胶质瘤[11, 12]、乳腺癌[13]、食管癌[14]、肝癌[15]、黑色素瘤[16]、结肠癌[17]。另外，从患者肿瘤组织标本中可以检测到T-型钙通道表达上调。同时这些报道表明T-型钙通道的小分子拮抗剂或者利用RNA干扰技术下调T-型钙通道的表达可以抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡。因此，T-型钙通道可以成为肿瘤治疗的一个新靶点。T-型钙通道具有一些独特的电生理学特征：低电压激活、快速失活、慢速去激活、低电导等[18]。目前为止，已经发现T-型钙通道存在三种不同的α亚单位，即α1G (Cav3.1)、α1H (Cav3.2)、α1I (Cav3.3) [18]。在低电压状态下，T-型钙通道可以产生“窗电流”-持续性内向钙电流[19]。因此，T-型钙通道非常适合在静息状态下调节胞内钙震

荡，T-型钙通道的这种特性决定了T-型钙通道可以调控细胞的增殖、凋亡和死亡。另外，越来越多的证据表明T-型钙通道的表达具有细胞周期依赖性[20, 21, 22, 23]。

米贝拉地尔是T-型钙通道特异性阻断剂，它对T-型钙通道的选择性是L-型钙通道的10-20倍[24]。NNC-55-0396是米贝拉地尔的结构类似物，对T-型钙通道具有更高的选择性。研究表明NNC-55-0396在高达100μM的浓度下对L-型钙通道没有影响；而抑制T-型钙通道的IC50仅为6.8μM (HEK293细胞)，具有和米贝拉地尔相比拟的功效(IC50为10.1μM) [25]。越来越多的数据表明米贝拉地尔和NNC-55-0396可以通过抑制T-型钙通道的功能来抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡[11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 24, 25]。另外，米贝拉地尔被美国FDA批准用来治疗卵巢癌（2007）、胰腺癌（2008）和多形性恶性胶质瘤（2009）。然而，目前关于T-型钙通道拮抗剂抗癌的作用机制尚不清楚。

本课题主要研究T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的功能。研究结果表明T-型钙通道拮抗剂-米贝拉地尔和NNC 55-0396通过抑制T-型钙通道的功能来抑制白血病细胞增殖和诱导白血病细胞凋亡，其诱导白血病细胞凋亡与破坏内质网的钙稳态有关。同时我们研究还发现T-型钙通道拮抗剂可以下调ERK信号通路。由于正常人外周血细胞不表达T-型钙通道，因此T-型钙通道拮抗剂可以成为治疗急性淋巴细胞性白血病的一个新方法，而对于血液系统表现为较小的副作用。

## **1** 实验材料和方法

### **1.1** 材料

#### **1.1.1** 标本和细胞株

临床外周血标本采集时间为2013年6月，分别收集8例健康男性和8例健康女

性外周血5-10 ml，遵守国家人体试验委员会所制定的伦理学标准，并征得受试者的同意。MOLT-4细胞株（急性淋巴母细胞白血病细胞）购买于美国ATCC公司，Jurkat (急性T淋巴细胞白血病细胞), Ball (急性B淋巴细胞白血病细胞), HL-60 (急性早幼粒白血病细胞), NB4 (急性早幼粒细胞白血病细胞), HEL (红白细胞白血病细胞), K-562（慢性髓原白血病细胞）和U937（单核细胞白血病细胞）均为本实验室保存。

#### **1.1.2** 主要仪器及产地

倒置显微镜IX-70: OLYMPUS公司

荧光倒置显微镜Ti-U: Nikon公司

二氧化碳培养箱CCL-170B-8: ESCO公司

二氧化碳培养箱CB150: Binder公司台式高速冷冻离心机UNIVERSAL 32R: Hettich公司台式高速离心机UNIVERSAL 320: Hettich公司

台式高速离心机ROTINA 420: Hettich公司

手掌型离心机LX-100：江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

脱色摇床TS-2:江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

脱色摇床TS-92:江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

电热恒温水浴锅DK-S22:上海精宏实验设备有限公司

纯水仪VPW-10N:北京历元电子仪器公司

数控超声波清洗器KQ-50DE：昆ft市超声仪器有限公司

酸度计DELTA 320: METTLER公司

洁净工作台SW-CJ-2F：苏净安泰公司

半自动凝胶图像分析仪 GDS-8000: ULTRO-VIOLET 公司超低温冰箱 ULT1386-7－V14: REVCO 公司

微型垂直电泳系统PowerPac200: Bio-RAD公司

电泳槽DYY-Ⅲ33B：北京市六一仪器厂

高电流电泳仪PowerPac HC: Bio-rad公司

基础电泳仪PowerPac Dasic: Bio-rad公司

小型垂直电泳槽：Bio-rad公司

半干转印系统：Bio-rad公司

电子天平AE240: METTLER公司

X线射影暗匣XJX-Ⅲ：上海跃进以用光学器械厂

流式细胞仪Accuri C6: BD公司

普通PCR仪Pro S: Eppendorf公司

凝胶成像系统： Bio-rad 公司

微量移液器：Eppendorf公司

定量PCR仪CFX96: Bio-rad公司

微电极拉制仪P-97: Sutter公司

电极抛光仪CPM-2: ALA公司

四通道灌流系统BPS-4: ALA公司

膜片钳放大器200B: Axon公司

数模/模数转换器Digidata 1320A: Axon公司

手动显微操作器MP-285: Sutter公司

蠕动泵BT00-100M:保定兰格恒流泵有限公司

防震台： TMC 公司

酶标仪SpectraMax M3: MD公司

制冰机： SANYO DENKI 公司

恒温烤箱：SANYO DENKI公司

#### **1.1.3** 主要试剂及生产厂商

胎牛血清：Gibco公司

胎牛血清：PAA公司

1640培养基：Gibco公司(不含HEPES)

1640培养基：Hyclone公司

双抗： MP 公司

DMSO: Sigma-Aldrich 公司

淋巴细胞分离液：[天津市灏洋生物制品科技有限责任公司](http://www.docin.com/p-586896003.html)

RNA提取试剂盒：天根生化科技有限公司

反转录试剂盒：Promega公司

DNA Marker：天根生化科技有限公司

PCR Mix: 康为世纪

PCR引物：Invitrogen公司，上海生工公司

琼脂糖：AGAROSE公司

SYBR Green PCR Mix: Takara公司

SYBR GreenⅠ：[北京百泰克生物技术有限公司](http://www.biomart.cn/bioteke/index.htm)

Loading buffer：南京凯基生物科技发展有限公司

DNA marker：南京凯基生物科技发展有限公司

RIPA裂解液（强）：碧云天公司

Western及IP裂解液：碧云天公司

PMSF晶体：碧云天公司

蛋白磷酸酶抑制剂：Sigma-Aldrich公司

BCA蛋白定量试剂盒：碧云天公司

5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液： 碧云天公司

SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒：碧云天公司

预制胶：上海文渊阁生物科技有限公司

预染蛋白彩色Marker: Thermo公司

丽春红染色液：碧云天公司

封闭液：武汉博士德生物工程有限公司

一抗稀释液：碧云天公司

Tween-20: Amresco公司

anti-Cav3.1: Alomone Labs公司

anti-Cav3.2: Alomone Labs公司

anti- Cav3.3: Alomone Labs公司

anti-ERK1/2: Cell Signaling公司

anti-pERK1/2: Cell Signaling公司

anti-GAPDH：杭州贤至生物科技有限公司

OKT3: R & D Systems公司

二抗稀释液：碧云天公司

辣根过氧化物酶标记兔二抗：Santa Cruz公司

ECL化学发光试剂盒：Advansta公司

显影粉、定影粉：天津市世纪奥博商贸有限公司

PBS: Hyclone 公司

多聚甲醛: Sigma-Aldrich公司

聚左旋赖氨酸：Sigma-Aldrich公司

Triton-X100: Amresco公司

BSA牛血清白蛋白：Amresco公司

FITC标记兔二抗：Santa Cruz公司

DAPI：碧云天公司

Mibefradil: Sigma-Aldrich公司

NNC-55-0396: Sigma-Aldrich公司

细胞增殖检测试剂盒：Promega

细胞周期检测试剂盒：南京凯基生物科技发展有限公司

细胞凋亡检测试剂盒：南京凯基生物科技发展有限公司

Fluo-4/AM: Invitrogen公司

Thapsigargin: Sigma-Aldrich公司

Ionomycin: Cell Signaling公司

Bay K8644: Sigma-Aldrich公司

线粒体膜电位检测试剂盒：碧云天公司

环孢素A: Cell Signaling公司

Ru360: Calbiochem公司

甘氨酸：Biosharp公司

Tris base: VETEC 公司

SDS: Sigma-Aldrich公司

#### **1.1.4** 主要耗材及生产厂家

15 ml无菌离心管：Corning公司

50 ml无菌离心管：Corning公司

6孔培养板：Corning公司

12孔培养板：Corning公司

24孔培养板：Corning公司

96孔培养板：Corning公司

培养皿：Corning公司

细胞培养瓶：Corning公司

96 孔PCR 板： Bio-rad 公司

8 连管： Roche 公司

200 µl 无RNA 酶EP 管： Axygen 公司

0.6 ml 无RNA 酶EP 管： Axygen 公司

1.5 ml 无RNA 酶EP 管： Axygen 公司

10 µl 无RNA 酶枪头： Axygen 公司

200µl无RNA酶枪头：Axygen公司

1 ml 无RNA 酶枪头： Axygen 公司

医用X射线胶片柯达X-OMAT：锐珂（厦门）医疗器械有限公司

滤纸：Bio-rad公司

PVDF膜：Millipore公司

细胞爬片：Thermo fisher公司

常规枪头：碧云天公司

常规EP 管： 碧云天公司

医用棉球：[新乡市予蒲医用卫生材料厂](http://www.mychemy.com/home/yupu1274969566)

医用酒精：利尔康公司

#### **1.1.5** 溶液的配置细胞冻存液：

93% FBS, 7% DMSO，预冷。

细胞培养基：

10% FBS +1640培养基+ 1%双抗。

1.0 mol/L Tris·HCl：

Tris (121.14) 30.29 g

双蒸水200 ml

用浓盐酸调整pH值后加水至250 ml，高压灭菌后室温保存。

1.5 mol/L Tris·HCl (pH8.8)：

Tris (MW 121.14) 45.43 g

双蒸水200 ml

用浓盐酸调整pH值至8.8，最后加水至250 ml，高压灭菌后室温保存。

0.5 mol/L Tris·HCl (pH6.8)：

Tris (MW 121.14) 15.14 g

双蒸水200 ml

用浓盐酸调整pH值至6.8，最后加水至250 ml，高压灭菌后室温保存

TE缓冲液(pH8.0)：

1 M Tris-HCl Buffer (pH8.0) 5 ml

0.5 M EDTA (pH8.0) 1 ml

向烧杯中加入约400 ml dd H2O均匀混合，将溶液定容到500 ml后，高温高压灭菌，室温保存。

DEPC水：

1000 ml双蒸水中加1 ml DEPC，放在1000 ml容量瓶中静置4 h后高压，室温保

存。

5×TBE（贮存液）：

Tris碱54 g

硼酸27.5 g

Na2EDTA·2H2O (pH8.0) 3.72 g

加蒸溜水定容至1000 ml，室温保存。电泳液缓冲液：

Tris 3.03 g

甘氨酸18.77 g

SDS 1 g

加蒸馏水至定容至1000 ml，室温保存。转移缓冲液：

甘氨酸 2.9 g

Tris 5.8 g

SDS 0.37 g

甲醇200 ml

先用蒸馏水溶解甘氨酸、Tris 和SDS，然后再加入甲醇，最后加蒸馏水至1000 ml，溶解后室温保存。

5×SDS上样缓冲液：

0.5 mol/L Tris·HCl(pH6.8) 2.5 ml

二硫叔糖醇（DTT, MW154.5）0.39 g

SDS 0.5 g

溴酚蓝0.025 g

甘油2.5 ml

混匀后，分装于1.5 ml离心管中，4°C 保存。

PBS缓冲液：

NaCl 10 g

KCl 0.25 g

Na2HPO4 1.44 g

KH2HPO4 0.25 g

用NaOH调整pH值至7.4，加蒸馏水定容至1000 ml。

TBS缓冲液：

## 1 mol/L Tris·HCl (pH7.5) 10 ml

NaCl 8.8 g

加蒸馏水定容至1000 ml。

TBST缓冲液：

20% Tween20 1.65 ml

TBS 700 ml

丽春红染色液：

丽春红S 0.1 g

乙酸0.1 ml

加蒸馏水定容至100 ml，室温保存。

考马斯亮蓝染色液：

考马斯亮蓝R-250 1.25 g

甲醇227 ml

冰醋酸46 ml

将三者混合搅拌混匀，加入蒸馏水定容至500 ml。高甲醇脱色液：

甲醇227 ml

冰醋酸37.5 ml

两者混匀，然后加入蒸馏水定容至500 ml。通透剂：

Tritionx-100 50μl

PBS 10 ml

震荡混匀，隔周重配。台式液：

NaCl 8.19 g

KCl 0.4023 g

MgCl2.6 H2O 0.2033 g

CaCl2 0.222 g

HEPES 2.383 g

Glucose 1.9817 g

用NaOH调整pH值至7.4，最后加蒸馏水定容至1000 ml。正常电极内液：

K- aspartate 1.5408 g

KCl 0.298 g

MgCl2.6 H2O 0.02033 g

Na2ATP 0.1816 g

EGTA 0.3804 g

HEPES 0.2383 g

NaCl 0.0584 g

用KOH调整pH值至7.2，最后加蒸馏水定容至100 ml。钡记录液：

BaCl2 2.4426 g

TEA-Cl 9.1135 g

CsCl 0.8418 g

HEPES 1.1915 g

Glucose 0.9909 g

用TEA-OH调整pH值至7.4，最后加蒸馏水定容至500 ml。钙内液：

HEPES 0.1192 g

CsCl 0.1684 g

CsOH. H2O 0.8397 g

L- aspartic 0.6656 g

EGTA 0.1902 g

TEA-Cl. H2O 0.0829 g

Na2ATP.3H2O 0.0363 g

Na3GTP 0.0147 g

Creatine phosphate.2Na.4H2O 0.0196 g

MgCl2.6 H2O 0.0203 g

用CsOH调整pH值至7.2，最后加蒸馏水定容至50 ml。

**1.2方法**

#### **1.2.1** 细胞培养、复苏及冻存

##### **1.2.1.1** 细胞培养与传代

MOLT-4、Jurkat、Ball、HL-60、NB4、HEL、K-562和U937细胞株培养于改良型RPMI 1640培养基，含10% FBS、1%双抗。培养箱参数设置为5% CO2、37°C。根据细胞的生长状况每2-3 d换液1次。当细胞的密度达到2×106/ml 时，进行传代。传

代时，收集细胞于15 ml无菌离心管中，1000 rpm/min离心3 min，倒掉上清液，用新鲜的细胞培养液重悬细胞，细胞悬液加入培养瓶中继续培养。

##### **1.2.1.2** 细胞复苏

1）. 超净台紫外消毒30 min。预先打开水浴锅，使温度在37°C 左右。

2）. 佩戴眼镜和手套，从液氮罐中取出冷冻管。

3）. 迅速放入37°C[水浴](http://www.ebioe.com/yp/product-list-56.html)中，并不停摇动，在1 min内使其完全融化，用酒精棉球擦拭消毒放入超净台。

4）. 加入适量培养液后接种[于培养瓶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-984.html)中，置5% CO2、37°C细胞培养箱静置培养，次日更换一次培养液，继续培养，观察生长情况。大约1-2周细胞能够恢复到正常状态。

##### **1.2.1.3** 细胞冻存

1）. 选择处于对数生长期的细胞，在冻存前一天换液。将约5-10×106个细胞收集于[离心管](http://www.ebioe.com/yp/product-list-954.html)中离心，1000 rpm/min, 3 min。

2）. 去上清液，加入1 ml细胞冻存液(93% FBS + 7% DMSO)重悬细胞，把细胞悬液转入冻存管中，用封口胶封闭冻存管，标记好细胞名称和冻存日期，并作好登记（日期、细胞种类及代次、冻存支数）。

3). 采用下列步骤逐步降温：4°C 30 min→-20°C 1 h→-80°C 过夜→液氮。

#### **1.2.2** 外周血单个核细胞分离

1）. 常规无菌条件下采集血标本5 ml，肝素抗凝。在离心管中加入适量淋巴细胞分离液，取抗凝血与等量PBS缓冲液充分混匀，用滴管沿离心管壁缓慢叠加在人淋巴细胞分离液之上，注意保持两液面界面清晰，1500-2000 rpm/min 离心15-20 min。

2）. 经离心后管内液体分三层，上层为血浆和PBS缓冲液，下层主要为红细胞和粒细胞，中层为淋巴细胞分离液，在中上层液面处有一白色云雾状狭窄带，即为富含淋巴细胞和单核细胞的单个核细胞(PBMCs)及血小板。小心吸去最上层的血浆，吸取中间白膜层，然后转移至另一新的离心管中，PBS 洗涤2次，1000 rpm/min, 5-10 min，弃上清。

3）. 用白细胞计数板于显微镜下计数细胞，PBS调整细胞密度至1×107/ml，按1 ml/管分装入经DEPC处理的1.5 ml EP管中，2000 rpm/min离心5 min，弃上清，备用。

#### **1.2.3 RT-PCR** 和实时定量**PCR**

##### **1.2.3.1** 细胞总**RNA**提取（**RNAsimple**总**RNA**提取试剂盒）

1）. 实验所需EP管、枪尖要用0.1 % DEPC溶液浸泡过夜，高温高压灭活后置烤箱烘干。实验用水加入DEPC，使浓度为0.1 %，室温过夜，高压后备用。

2）. 离心收取5-10×106细胞，弃上清。加入1 ml裂解液RZ。收集的外周血单个核细胞每个标本加入1 ml裂解液RZ。

3）. 15-30°C 放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

4）. 加入200μl氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 s，室温放置3 min。

5）. 4°C 12,000 rpm/min (~13,400×g)离心10 min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液RZ试剂的50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。

6）. 缓慢加入0.5倍体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，4°C 12,000 rpm/min (~13,400×g)离心30 s，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱CR3，请分两次转入吸附柱CR3 中，4°C 12,000 rpm/min (~13,400×g)离心30 s，弃掉收集管中的废液。

7）. 向吸附柱CR3 中加入500μl 去蛋白液RD（使用前请先检查是否已加入乙醇），4° C

12,000 rpm/min (~13,400×g) 离心30 s，弃废液，将CR3放入收集管中。

8). 向吸附柱CR3 中加入700 μl 漂洗液RW（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min, 4°C 12,000 rpm/min (~13,400×g) 离心30 s，弃废液。

9）. 重复操作步骤 8

10）. 将吸附柱放入2 ml收集管中，4°C 12,000 rpm/min (~13,400×g)离心2 min，去除残余液体。（此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT-PCR 等实验操作。）

11). 将吸附柱CR3转入一个新的1.5 ml离心管中，加30-100μl RNase-Free ddH2O，室温放置2min, 4°C 12,000 rpm/min (~13,400×g) 离心2 min。

（洗脱缓冲液体积不应少于30μl，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70°C，以防降解。）

**1.2.3.2 RNA纯度和浓度的测定及完整性的检测**

1）. RNA纯度及浓度的测定

取提取的RNA溶液1μl，用1μl的DEPC水稀释混匀，加入到微量核酸测试板孔中，然后用酶标仪测定OD260、OD280值。RNA纯度为OD260/280，正常在1.8-2.0之间，如果小于1.8可能是蛋白质含量较多，大于2.0则有可能是DNA含量较多。浓度计算公式为：RNA (μg/mL) = OD260×40×稀释倍数。

2). RNA完整性检测

用90 ml无酶dd H2O加热融化1.0 g琼脂糖，冷却至60°C，然后加入10 ml 的

10×MOPS电泳缓冲液和5.4 ml 37 %甲醛，最后加入6μl EB (10 ug/ml)混匀。将上述混合溶液注入经3 % H2O2和0.1 % DEPC-dd H2O处理过的电泳槽中，冷却后即制成1 %甲醛变性琼脂糖凝胶。取10μl RNA溶液，加5μl甲醛上样缓冲液混匀，之后加入到凝胶上样孔中，将1×MOPS电泳缓冲液加入到电泳槽中，120 V恒压电泳，待溴酚兰走至全胶的3/4时（约30 min），结束电泳。在紫外光透射仪中观察，拍照28S RNA和18S RNA，确定其比值。当28S/18S约为2: 1时，说明RNA稳定并且无降解，可以用于RT-PCR 及实时定量PCR实验。

##### **1.2.3.3** 逆转录反应合成**cDNA**

1）. 每组成份先混匀，然后瞬时离心，按下面顺序加样：

成份体积（µl）

总RNA (1- 5µg) X

Primer Oligo(dT) 15(0.5µg) 1

and/or

Random Primer (0.5µg) 1

Nuclease-Free Water X

Final volume 5

2）. 70°C孵育5 min，立刻将微量离心管插入冰浴中至少5 min，微量离心机离心10 s，置于冰上。

3）. 按下表进行反转录操作（冰上操作）：

成份体积

GoScript™5X Reaction Buffer 4.0µl

MgCl2 (final concentration 1.5–5.0mM) 1.2-6.4µl

PCR Nucleotide Mix 1.0µl

Recombinant RNasin®Ribonuclease Inhibitor (optional) 20 units

GoScript™Reverse Transcriptase 1.0µl

Nuclease-Free Water (to a final volume of 15µl) Xµl

Final volume 15µl

4). 把 15 µl 反转录混合物和 5 µl RNA 与 Primer 混合物混合在一起。

5). 25 °C ，5 min。

6). 42 °C ，1 h。

7). 70 °C ，15 min 灭活。

8). 置于 -80 °C 或 -20 °C 保存。

##### **1.2.3.4** **PCR**

PCR反应体系见下表，引物序列、产物长度及PCR反应条件见表1.1。将表内组分混匀后加入PCR管内，瞬时离心，94°C, 2 min→(94°C, 30 s; X°C, 30 s; 72°C, 1 min)

×(35-37)循环→72°C, 7 min→4°C, 保存。

|  |  |
| --- | --- |
| 成份 | 体积 (µl) |
| 2×PCR Taq Mix | 10 |
| 上游引物 (10 µM) | 1 |
| 下游引物 (10 µM) | 1 |
| cDNA 模板 | 1 |
| ddH2O | 7 |
| 总体积 | 20 |

Table 1.1 Oligonucleotides used to amplify transcripts of T-type Ca2+ channels

| Target | Sequence | Product size (bp) | Temp. |
| --- | --- | --- | --- |
| α1G | F: 5’-TGCTCTGCTTCTTCGTCTTCTT -3’ | 152 | 60.0 °C |
|  | R: 5’-CTCATCCTCGTTCTCTGTCTGGT-3’ |  |  |
| α1H | F: 5’-TTGGGTTCCGTCGGTTCT-3’ | 193 | 56.5 °C |
|  | R: 5’-ATGCCCGTAGCCATCTTCA-3’ |  |  |
| α1I | F: 5’-ATCGGTTATGCTTGGATTGTCA-3’ | 203 | 54.0 °C |
|  | R: 5’-TGCTCCCGTTGCTTGGTCTC-3’ |  |  |
| GAPDH | F: 5’-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3’ | 258 | 57.5 °C |
|  | R: 5’-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3’ |  |  |

##### **1.2.3.5** 电泳鉴定

1）. 5×TBE取200 ml稀释成1000 ml，取50 ml溶解0.6 g琼脂糖，微波炉煮沸。剩余的TBE缓冲液倒入电泳槽中。

2). 琼脂糖溶液冷却至温热时，倒入带梳子的电泳板中，冷却后，放入电泳槽中，小心拔出梳子。 3)。加样：PCR Marker: 5µl Marker＋1µl SYBE GreenⅠ混匀，加入孔中。PCR样品：10

µl样品＋1µl SYBE GreenⅠ混匀后依次加入孔中。

4）. 接上电源，电压80 V，进行电泳。

5）. 电泳约1 h后，紫外灯检测并拍照。

##### **1.2.3.6** **Q-PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| 成份 | 体积 (μl) |
| SYBR Premix DimerEraser (2 ×) | 10 |
| 上游引物 (10 μM) | 0.6 |
| 下游引物 (10 μM) | 0.6 |
| cDNA 模板 | 1 |
| ddH2O | 7.8 |
| 总体积 | 20 |

引物序列见表1.1，将下表内组分混匀后加入96孔PCR板内，瞬时离心，95°C，30 s→95°C，5 s；60°C，1 min (40个循环)。每一样品均设3个复孔，计算其均值作为CT值。每次PCR反应后均进行熔解曲线分析以确认扩增产物的特异性。目的基因表达量以△Ct 表示，△Ct =目的基因CT值－参考基因CT值。

**1.2.4 Western Blot**

1.2.4.1**细胞总蛋白的提取** 1）。融解Western/IP或RIPA细胞裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入PMSF，使PMSF的最终浓度为1 mM。对于需要研究磷酸化蛋白的样品，加入1 %的蛋白磷酸酶抑制剂。

2）. 离心收集细胞，用PBS漂洗1次，用手指把细胞用力弹散。按照每1-2×106个细胞加入100µl细胞裂解液的比例加入裂解液。再用手指轻弹以充分裂解细胞，4°C或冰上放置20-60 min, 充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。

3). 充分裂解后，10000-14000g/min 4°C 离心10 min，取上清，即可进行后续的Western

操作，或将上清保存于-80°C。

注意： 以上所有步骤均需冰上或 4 °C 操作。

##### 1.2.4.2 **BCA 法 蛋 白 定 量** 1). 取蛋白标准品 BSA 充分溶解于 PBS，配制成 25 mg/ml 的蛋白标准溶液母液。配制后可立即使用，也可以 -20 °C 长期保存。

2). 取适量 25 mg/ml 蛋白标准，用 PBS 稀释至终浓度为 0.5 mg/ml。

3). 根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量

BCA工作液，充分混匀。BCA工作液室温24 h内稳定。

4）. 将标准品按0，0.625，1.25，2.5，5，10，20μl加到96孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到20μl。

5）. 加适当体积样品到96孔板的样品孔中，加标准品稀释液到20μl。

6). 各孔加入200μl BCA工作液，37°C 放置30 min。

7）. 测定A562 OD值。根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

##### **1.2.4.3** **SDS-PAGE**电泳

1）. 玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。

2）. 按下表配12%分离胶，加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。灌胶时，可用1 ml枪吸取胶沿玻璃边缘缓缓放出，待胶面升到绿带中间线高度时即可，注意避免气泡产生。然后胶上加一层水，以便促使胶的凝固和胶的平整。

|  |
| --- |
| 成份 体积 (ml) |
| ddH2O 3.3  30 % 丙烯酰胺 (Arc/Bis) 4.0  1.5 M Tris (pH 8.8) 2.5  10 % SDS 0.1  10 % APS 0.1  TEMED 0.004 |

3）. 当水和胶之间有一条折射线时，说明胶已凝。再等3 min使胶充分凝固就可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。

4）. 按下表配4%的浓缩胶，加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。灌胶时也要使胶沿玻璃板流下以免胶中有气泡产生。插梳子时要使梳子保持水平。由于胶凝固时体积会收缩减小，从而使加样孔的上样体积减小，所以在浓缩胶凝固的过程中要在两边补胶。待到浓缩胶凝固后，将其放入电泳槽中，加入电泳缓冲液，两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出。

|  |
| --- |
| 成份 体积 (ml) |
| ddH2O 4.1  30 % 丙烯酰胺 (Arc/Bis) 1.0  1.0M Tris (pH 6.8) 0.75  10 % SDS 0.6  10 % APS 0.6  TEMED 0.006 |

5）. 上样。根据测量的蛋白浓度，计算出上样量。样品中加入5×SDS 上样缓冲液至终浓

度为1×，95°C 5 min使蛋白充分变性。用微量加样器贴壁吸取样品，将样品吸出不要吸进气泡。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。

6）. 电泳。起始电压为80 V，当溴酚蓝前沿进入分离胶时，将电压升至120 V，继续电泳直到溴酚蓝到达分离胶底部时终止电泳。

##### **1.2.4.4** 转膜**(**半干转**)**

电泳结束后，将玻璃板撬开，除去小玻璃板后，将浓缩胶轻轻刮去（浓缩胶影响操作），根据Marker位置小心地把目的蛋白所在的条带切割下来，然后放入电转缓冲液中平衡15 min。将与分离胶大小相等的PVDF膜在甲醇中浸泡约2 min，电转专用滤纸同样放在电转缓冲液中平衡15 min。从负极到正极（从上到下）依次为：滤纸－凝胶－PVDF膜－滤纸，排除气泡，接通电源，20 V，转移15-60 min。取出PVDF膜，剪角以标记方向，过双蒸水以除去膜表面电转液，甲醇浸泡2 min，丽春红染色，观察在泳道上有无蛋白条

带以检测转膜是否成功，然后用双蒸水洗脱丽春红，进行下一步Western Blot操作。

##### **1.2.4.5** 免疫反应

1）. 将膜用TBS从下向上浸湿后，移至含有封闭液的孵育盒中，室温下脱色摇床上摇动封闭1 h。

2). TBST洗膜5 min。

3）. 将一抗用一抗稀释液稀释至适当浓度（具体浓度参考说明书和预实验结果），孵育盒中孵育一抗，4°C 摇床上孵育过夜。

4）. 回收一抗，取出膜，置摇床上TBST洗膜，3×5 min。

5）. 孵育二抗，摇床上室温孵育1 h. TBST洗膜，3×10 min。进行化学发光反应。

##### **1.2.4.6** 化学发光及显影、定影

在暗室中，将1×显影液和定影液分别倒入塑料盘中。在红灯下取出X－光片，用剪刀剪裁适当大小（比膜的长和宽均需大1 cm）。将膜取出，放于保鲜膜上平铺，将化学发光液A和B两种试剂等体积混合。然后将发光液滴加到膜蛋白面上，每条膜约0.5 ml，盖上保鲜膜，孵育2 min, 放入X－光片夹中曝光1-10 min（根据信号的强弱调整曝光时间），取出胶片显影、定影，用自来水冲洗残留的定影液后晾干。

##### **1.2.4.7** 凝胶图象分析

将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

#### **1.2.5** 免疫荧光

实验原理：细胞免疫荧光法（immunofluorescence, IF）是根据抗原抗体反应的原理，先将荧光素标记在已知的抗原或抗体上制成荧光标记物，再用这种荧光抗体（或抗原）作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原（或抗体）。因为在细胞中形成的抗原抗体复合物上标记有荧光素，荧光素在荧光显微镜上受激发光的照射而发出明亮的荧光（黄绿色或桔红色），从而判断荧光所在的细胞上抗原或抗体的表达的强弱、性质、定位，以及利用定量技术测定含量。

实验步骤：

1）. 离心收集细胞，用PBS漂洗1次。

2）. 用4%多聚甲醛室温下固定20 min。

3）. PBS漂洗固定液，把细胞均匀地铺在左旋多聚赖氨酸包被的盖玻璃片上，室温下放置

2 h以便使细胞牢固地贴伏在盖玻片上。

4). 用0.5% Triton-X100 室温下作用10 min使细胞膜通透，PBS漂洗2次。

5). 5% BSA室温摇床上封闭1 h。

6）. 孵育一抗：用免疫染色一抗稀释液稀释一抗(1: 50)，剪一片合适大小的parafilm，平铺在六孔板盖子上，把稀释后的一抗滴在封口膜上面，然后把盖玻片盖在上面（细胞面朝下）。放入保湿盒中4°C 孵育过夜。

7）. 回收一抗，盖玻片用PBS在摇床上轻轻漂洗，3×5 min。

8）. 孵育二抗：用免疫染色二抗稀释液稀释绿色荧光标记的羊抗兔二抗(1: 200)，剪一片合适大小的parafilm，平铺在六孔板盖子上，把稀释后的二抗滴在封口膜上面，然后把盖玻片盖在上面（细胞面朝下）。室温下避光孵育1 h。

9）. 回收二抗，盖玻片用PBS在摇床上轻轻漂洗，3×10 min。

10）. 5μg/ml DAPI滴在PE手套上，盖玻片盖在上面（细胞面朝下），染色2 min. PBS漂洗2次 。

11）. 抗淬灭封片剂封片。

12）. 荧光倒置下显微镜观察，拍照。

#### **1.2.6** 电生理记录

MOLT-4细胞铺在左旋多聚赖氨酸包被的盖玻片上，培养2 d后进行实验。细胞置于倒置显微镜(Olympus IX-70)上的灌流槽中，用标准台氏液灌流冲洗细胞。记录T-钙电流细胞外液（灌流液） 为(mmol/L): 10 HEPES, 110 tetraethylammonium-Cl (TEA-Cl), 10 CsCl, 20 BaCl2, 10 glucose, 用TEA-OH调整pH值为7.4。记录电极利用P-97拉制仪采用两步法进行拉制并抛光。冲灌电极内液后电阻为3-5 MΩ，电极内液成份为

(Mmol/L): 10 HEPES, 20 CsCl, 100 CsOH, 100 L-aspartate, 2 MgCl2, 10 TEA-Cl, 10 EGTA,

### 1.2 Na2ATP, 0.5 Na3GTP, 1.2 Creatine phosphase, 用CsOH调整pH值为7.2。在记录钙电流(钡电流)时，采用传统的全细胞膜片钳记录技术，所用设备为Axopatch 200B放大器和Digidata 1320A数模/模数转化器(Axon Instruments, CA, USA) 。采样频率为5

KHz, 滤波频率为1 KHz。电极入液后对液接电位进行补偿，封接成功后补偿电极电容，破膜后补偿膜电容，并对串联电阻进行补偿（约80%）。破膜后液接电位没有补偿。细胞

钳制电位为- 80 mV，测试电位为-60 mV到+30 mV，每个台阶增加10 mV. 记录静息膜电位时采用电流钳模式，细胞外液成份为(mmol/L): 140.0 NaCl, 5.4 KCl, 1.0 MgCl2,

1.8 CaCl2, 2.3 NaOH, 10.0 HEPES, 10.0 glucose, 用NaOH调整pH值为7.4；细胞内液成份为(mmol/L): 10.0 NaCl, 40.0 KCl, 90 K-aspartate, 1.0 MgCl2, 3.0 Na2ATP, 10.0 EGTA，

10.0 HEPES, 用KOH调整pH值为7.2，静息膜电位通过示波器读出。实验后用Clampfit 9.0, Sigmaplot 10.0和Origin 7.0软件分析。实验在室温下进行。

#### **1.2.7** 细胞增殖实验

实验原理：为MTS[3-(4,5-diethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfop henyl) -2H-etrazolium, inner salt]为新一代四氮唑蓝盐化合物，其可被活细胞线粒体中的多种脱氢酶还原成各自有色的甲瓒产物，其颜色深浅与某些敏感细胞株的活细胞数在一定范围内呈高度相关，通过酶标仪上测定其光密度（OD）值，可以检测活细胞数目的相对量。

实验步骤：

1）. 收集对数期生长细胞，调整细胞悬液浓度，铺板，每孔加入90µl细胞悬液，使细胞

密度为1-2×104 /孔，边缘孔用无菌PBS填充。培养箱培养3 h。

2）. 用培养基稀释药物，加入浓度梯度的药物，使最终每孔的体积为100µl。每个药物

浓度设3个复孔。

3). 培养箱5% CO2, 37°C 培养48 h。

4). 每孔加入20µl CellTiter 96 AQ One Solution Reagent，继续培养2 h。

5）. 在酶联免疫检测仪测量各孔的OD490 nm和OD650 nm处吸光值，以浓度为横坐标，吸光值为纵坐[标绘制细胞生长](http://www.bio1000.com/zhuanti/product/201308/444185.html)曲线。

#### **1.2.8 T-**型钙通道**α1G**和**α1H**基因的敲除

##### **1.2.8.1** **RNAi**慢病毒载体的制备

首先合成含干扰序列的单链DNA oligo，然后退火配对产生双链，再通过其两端所含酶切位点直接连入酶切后的RNAi慢病毒载体上；将连接产物转入制备好的细菌感受态细胞，PCR鉴定阳性重组子后，送测序验证，测序结果经比对确认正确的克隆即为构建成功的目的基因RNAi慢病毒载体（构建流程见下图）。



**1.2.8.1.1干扰序列的设计**

干扰序列参照前期发表的文献报道[13]，序列为：Cav3.1/3.2, 5'- GCCATCTTCCAGGTCATCACA-3'。阴性对照序列为：

5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'，由上海吉玛公司(Genepharma) 设计及合成。

**1.2.8.1.2双链DNA Oligo制备**

将合成后的成对引物干粉溶解于退火的缓冲液中，90°C水浴15 min，自然冷却，得到shRNA模板，4°C 保存。理论配对结果如下，TTTTT 是终止信号。

Scrambled-shRNA:

CCGG**TTCTCCGAACGTGTCACGT**TTCAAGAGA**ACGTGACACGTTCGGAGAA**TTTTTG

**AAGAGGCTTGCACAGTGCA**AAGTTCTCT**TGCACTGTGCAAGCCTCTT**AAAAACTTAA

Cav3.1/3.2- shRNA:

CCGG**GCCATCTTCCAGGTCATCACA**CTCGAG**TGTGATGACCTGGAAGATGGC**TTTTTG

**CGGTAGAAGGTCCAGTAGTGT**GAGCTC**ACACTACTGGACCTTCTACCG**AAAAACTTAA

酶切位点说明如下图：



**1.2.8.1.3克隆制备与鉴定**

1）. 感受态制备配置下述溶液：

A. 用 0.45 µm 无菌滤膜过滤除菌 0.1 M 的 CaCl2 溶液。

B. 250 mM KCl 溶液。

C. 高压灭菌 2 M MgCl2 溶液。

D. 配制 SOB 液： 1 ml 的 250 mM KCl 溶液加入 100 ml LB，以 5 M 的 NaOH 调

PH值至7.0，高压灭菌，在临用前加入0.5 ml的2 M MgCl2溶液。用氯化钙制备新鲜大肠杆菌感受态细胞：

A. 用灭菌小枪头于37°C 培养16 h的新鲜平板中挑取一个单菌落，然后转到一个含有

100 ml SOB培养基的1 L烧瓶中。37°C 240 rpm振摇培养3 h。

B. 无菌条件下将细菌转移到另一个无菌、一次性、冰预冷的50 ml聚丙烯管中，冰上放置约10 min。

C. 4°C, 4000 rpm，离心10 min。

D. 弃上清，将管冰上倒置1 min，弃去最后残留的少量培养液。

E. 用冰预冷的0.1 mol/L CaCl2 10 ml重悬沉淀。

F. 4°C, 4000 rpm离心10 min。

G. 重复步骤D。

H. 每50 ml初始培养物用2 ml冰预冷的0.1 mol/L CaCl2重悬沉淀。

I. 分装成小份，每份100µl, -70°C 保存（参考分子克隆实验指南）。

2）. 连接与转化

通过T4 DNA连接酶将双酶切线性化的载体和DNA片段在适当的buffer中进行连接反应，连接后的产物进行转化实验。于16°C连接过夜，连接产物进行转化实验。连接反应通用体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 体积 ( µl ) |
| 酶切后载体 DNA 100 ng/µl DNA oligo 100 ng/µl  10 ×T4 DNA 连接酶缓冲液  T4 DNA 连接酶  Dd H2O | 1  1  2  1  补足至 20 |

配置下述溶液：

A. 250 mM的KCl溶液。

B. 高压灭菌2 M MgCl2溶液。

C. 配制SOB培养基：将1 ml 250 mM KCl溶液加入到100 ml LB中，以5 M NaOH

调整PH值至7.0，高压灭菌，在临用前加入0.5 ml 2 M MgCl2溶液。

D. SOB琼脂培养基：秤0.49396 g MgSO4•7H2O 溶于100 ml SOB培养基中，加入1.5

g的琼脂粉并高压灭菌，冷至温度低于60°C后加入Amp至终浓度100µg/ml，混匀并铺板，一般90 mm直径平皿需30-50 ml培养基。

E. 1 M葡萄糖溶液，过滤除菌。

F. SOC培养基：在100 ml SOB培养基中加入2 ml 1 M葡萄糖溶液。转化过程：

A. 用冷却的无菌吸头从每种感受态细胞悬液中各吸取100µl转移到无菌的微量离心管中，每管加2µl连接液，指端轻弹，混匀内容物，冰上放置30 min。

B. 42°C 水浴90 s，勿摇动试管，后快速冰浴，使细胞冷却1-2 min。

C. 加800µl SOC培养基，摇床上，37°C温育45 min；吸150µl已转化的感受态细胞，转移到含20 mmol/L MgSO4和Amp抗性(100µg/ml)的LB琼脂培养板上。

D. 将平板置于室温，当液体被吸收后再倒置平皿，37°C 培养16 h。



本实验所用GV115 慢病毒干扰载体图谱

3）. 阳性克隆测序结果分析

挑取单克隆进行测序，测序引物与鉴定引物中的上游引物相同。

##### **1.2.8.2** **RNAi**慢病毒包装与滴度检测

制备编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及两种辅助包装的原件载体质粒，三种质粒载体分别进行高纯度的无内毒素抽提，按Invitrogen公司Lipofectamine 2000使用说明，共转染293T细胞，8 h后更换为完全培养基，培养48 h后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液，然后进行浓缩，得到高滴度的慢病毒浓缩液，用293T细胞测定并标定病毒滴度。流程如下图。



1). LV-Cav3.1/3.2-RNAi 与LV-Scrambled-RNAi 慢病毒包装

A. 转染前24 h，用胰蛋白酶消化处于对数生长期的293T细胞，用含10 %血清的培养基调整细胞密度为1.2 x 107 个/20 ml，后接种于15 cm 细胞培养皿，置于37°C、5 %

CO2培养箱内培养。24 h后，当细胞密度达70 - 80 %时即可用于转染。

B. 转染前2 h更换细胞培养基为无血清培养基。

C. 在灭菌离心管中加入制备的各DNA液(GV115 载体20µg, pHelper 1.0载体15

µg, pHelper 2.0 载体10µg） 及相应体积的Opti-MEM，混合均匀，调整总体积为2.5 ml，

室温下温育5 min。

D. 轻柔摇匀Lipofectamine2000试剂后取100µl，在另一管中与2.4 ml Opti-MEM混合，室温下温育5 min。

E. 混合稀释后的DNA与Lipofectamine 2000，轻轻颠倒混匀，勿振荡。

F. 室温下温育20 min，以便形成DNA与Lipofectamine2000 的转染复合物。

G. 转移DNA与Lipofectamine2000 混合液至293T细胞的培养液中，混匀，37 °C ，

5% CO2 细胞培养箱中培养。

H. 8 h后倒去含有转染混和物的培养基，加入20 ml的PBS液，左右轻轻晃动培养瓶以洗涤残余的转染混和物，然后倒去。

I. 加入25 ml含10 %血清的细胞培养基，37°C、5 % CO2培养箱内继续培养48 h。

2）. 病毒的收获及浓缩

A. 收集转染后48 h的293T细胞上清液。

B. 4°C, 4000 g离心10 min，除去细胞碎片。

C. 以0.45µm滤器过滤收集上清液于40 ml超速离心管中。

D. 将病毒粗提液样品加到过滤杯中（最多19 ml），盖上盖子，插到滤过液收集管中。

E. 组合好后，平衡，放在转头上。

F. 4000×g离心，10 -15 min。

G. 取出离心装置，分开过滤杯和下面的滤过液收集杯。

H. 倒扣过滤杯在样品收集杯上。

I. 900 g离心，2 min，把过滤杯从样品收集杯上移开，收集杯中液体的即为病毒浓缩液。

J. 移出病毒浓缩液，分装后保存在病毒管中，-80°C长期保存，取一支进行病毒生物学滴度测定。

3）. 孔稀释法慢病毒滴度测定

A. 测定前一天，293T细胞铺96孔板，每孔加4×104个细胞，体积为100µl。

B. 根据病毒预期滴度，准备好7-10个无菌Ep管。每管中加入90µl的无血清培养基。

C. 取10µl待测定的病毒原液，加入到第一个管中，混匀后，取10µl加入到第二个管中，继续相同的操作直至最后一管。

D. 选取所需细胞孔，吸弃90µl培养基，加入90µl稀释好的病毒溶液，培养箱培养。

E. 24 h后，小心加入100µl完全培养基，不要吹起细胞。

F. 4 d后观察荧光表达情况。荧光细胞数随着稀释倍数的增加而减少，根据荧光图片中

GFP表达情况，比如，在加入1E-6µl的病毒原液的孔中观察到2个带有荧光的细胞，即说明该孔中至少有2个的病毒颗粒感染了细胞，则该病毒的滴度即等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量，也就是2/(1E-6) = 2E+6，单位为TU/µl，也就是等于2E+9 TU/ml。

##### **1.2.8.3** 慢病毒感染**MOLT-4** 细胞

1）. 感染条件的优化及MOI选择

A．实验前保证细胞处于良好的生长状态。离心收集细胞，用完全培养基重悬细胞后以每孔5×103个目的细胞接种于96孔培养板中，体积为90µl。

B．感染MOI值设为10、25、50、75、100.

C．取2µl 10 mg/ml polybrene 稀释到400µl，备用。

D．将10µl不同梯度的病毒加到各组的相应孔中。

E．在设定需要添加polybrene的孔中加入10µl的polybrene稀释液(终浓度1:2000)

混匀，继续培养。

F．8 -12 h后观察细胞的状态，1000 rpm/min离心5 min，更换新鲜培养基。

G．3-4 d后观察荧光表达情况，通过细胞感染效果，确定目的细胞的感染条件和感染参数。

2）. 正式的病毒感染实验

根据预实验得出的感染条件和感染参数，按照保持细胞密度的原则放大实验体系。

3). Cav3.1/3.2-shRNA与Scrambled-shRNA HL60 细胞株的筛选与鉴定

流式细胞分选仪分选GFP阳性细胞，实时定量PCR检测分选细胞的Cav3.1/3.2

表达水平。

#### **1.2.9** 细胞周期分析

实验原理：碘化丙啶(propidium iodide, PI)是常用的细胞核染料，一定波长的光下发出荧光，其强度与DNA含量成正比，因此将细胞用PI染核，通过流式细胞仪分析各时期的细胞百分数，可检测细胞周期时相。

实验步骤：

1）. 离心收集各组细胞。

2). 用PBS洗涤细胞2次，1000 rpm/min，每次5 min。

3). 去除上清，加入体积分数为70%冷乙醇500µl，4°C固定2 h. 用PBS洗去固定液(1000 rpm/min, 5 min×2次)。

4). 加入100µl RNase A, 37°C 水浴30 min。

5). 再加入400µl PI染色液混匀，4°C 避光30 min。

6）. 上机检测，流式细胞仪记录激发波长488 nm处红色荧光(FL2)，收集约1万个事件。

7）. 采用FlowJo软件分析细胞周期。

#### **1.2.10** 细胞凋亡检测

实验原理：在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸只分布在细胞膜脂质双层的内侧，而发生早期凋亡时，膜磷脂酰丝氨酸由脂膜内侧翻向外侧，AnnexinV是一种磷脂结合蛋白，与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力，故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此AnnexinV被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一；PI是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但凋亡中晚期的细胞和死细胞由于细胞膜通透性的增加，PI能够透过细胞膜而使细胞核染红。因此，将Annexin V与PI联合使用时，就能将早期凋亡细胞（Annexin V+/PI-）、晚期凋亡细胞(Annexin V+/PI+)和正常活细胞（Annexin V-/PI-）区分开来，将用Annexin V/PI双染过的细胞经过流式细胞仪分选，就可以测定各期细胞所占的比例。

实验步骤：

1). 收集各组细胞，用PBS洗涤细胞2次，2000 rpm/min，每次5 min，收集1-5×105

细胞。

2). 加入500µl的Binding Buffer 悬浮细胞。

3). 加入5µl Annexin V-FITC 混匀后，加入5µl Propidium lodide，混匀。

4）. 室温、避光、孵育15 min。

5）. 流式细胞仪上机检测，记录激发波长488 nm处的FL1和FL3。

6). 活细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞、死细胞由流式细胞仪软件自动计算得出。(i)活细胞: annexin V-FITC (-), PI (-); (ii)早期凋亡细胞: annexin V-FITC (+), PI (-); (iii)晚期凋亡细胞: annexin V-FITC (+), PI (+)；（ⅳ） 死亡细胞：annexin V-FITC (-), PI (+)。

#### **1.2.11** 胞内游离钙的测量

实验原理： 以钙离子敏感的荧光探针Fura-2/AM 或Fluo-4/AM 来检测细胞内

[Ca2+] i. Fluo-4/AM是继Fura-2/AM等之后研制的新一代Ca2+荧光指示剂，与Fura-2/AM类似，Fluo-4/AM进入细胞后，酯基被水解掉，Fluo-4与细胞内游离Ca2+结合，因而其荧光强度可以反映细胞内游离Ca2+的浓度。但优于Fura-2/AM的是，Fluo-4与Ca2+结合时的荧光强度较未结合Ca2+的游离形式高40 ~ 100倍，避免了自发荧光的干扰，因而直接在单波长激发光下检测其荧光强度即可反映[Ca2+] i的变化。此外，Fluo-4与Ca2+亲和力低，易解离，适合测定细胞内Ca2+的快速、微量变化。Fluo-4在可见光光谱激发，激发波长为488 nm，可避免紫外光对细胞的损伤。

实验步骤：

1）. 收集细胞，PBS清洗一次，1000 rpm/min, 5 min。去上清，用无血清1640培养基重悬细胞，加入适量的Fura-4/AM (终浓度为1µM)，避光，37°C 孵育1 h。

2）. 负载后的细胞用PBS清洗三次，1000 rpm/min，每次5 min，以充分洗去细胞外未负载的残余荧光染料。然后重悬于无血清1640培养基(Ca2+: 1.4 mM)或无钙液中，室温平衡30 min。

3）. 流式细胞仪检测细胞内游离钙离子浓度，激发波长488 nm，发射波长520 nm (FL1)。实验中用抗-CD3单克隆抗体(mAb), OKT3激活Jurkat T淋巴细胞，从而激活钙内流和胞内钙库释放。研究内质网钙稳态时采用thapsigargin (TG)诱导内质网钙释放。具体实验方法见下文。

#### **1.2.12** 线粒体膜电位测定

实验原理：细胞凋亡的过程中往往伴随着线粒体跨膜电位的破坏，这被广泛认为是细胞凋亡过程中最早发生的事件之一。JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential)∆Ψm的理想荧光探针。JC-1有单体和多聚体两种存在状态，在线粒体膜电位较高时，JC-1聚集在线粒体的基质中，形成聚合物，可以产生红色荧光，流式检测通常为FL-2通道（和PI同通道）；在线粒体膜电位较低时，JC-1不能聚集在线粒体的基质中，此时JC-1为单体，可以产生绿色荧光，用流式检测时，通常为FL-1通道（和FITC同通道）。因JC-1浓度的变化，在单体和多聚体之间形成一个可逆的转变过程。正常细胞，膜电位正常时，JC-1通过线粒体膜极性进入线粒体内，并因浓度升高而形成发射红色荧光的多聚体，而凋亡细胞，线粒体跨膜电位去极化，JC-1从线粒体内释放，浓度降低，逆转为发射绿色荧光的单体形式。故而可以通过检测绿色和红色荧光来定性（细胞群的偏移）定量（细胞群的荧光强度）的检测线粒体膜电位的变化。实验步骤：

1）. JC-1染色工作液的配制

细胞悬液每50-100万细胞需0.5 ml JC-1染色工作液。取适量JC-1 (200×)，按照每50µl JC-1 (200×)加入8 ml超纯水的比例稀释JC-1。剧烈Vortex充分溶解并混匀JC-1。然后再加入2 ml JC-1染色缓冲液（5×），混匀后即为JC-1染色工作液。

2）. 阳性对照的设置

10 mM的CCCP按照1: 1000 的比例加入到细胞培养液中，稀释至10μM，

处理细胞20 min。

3）. 离心收集细胞，约10-60万个细胞，去上清，重悬于0.5 ml无血清细胞培养液中。

4）. 加入0.5 ml JC-1染色工作液，颠倒数次混匀。细胞培养箱中37°C 孵育20 min。

5）. 在孵育期间，按照每1 ml JC-1染色缓冲液（5×）加入4 ml蒸馏水的比例，配制适量的JC-1染色缓冲液(1×)，4°C 保存。

6）. 37°C孵育结束后，1000 rpm/min 4°C离心5 min，沉淀细胞。弃上清，注意尽量不要吸除细胞。

7). 用JC-1染色缓冲液（1×）洗涤2次：加入1 ml JC-1染色缓冲液（1×）重悬细胞，

1000 rpm/min 4°C 离心5 min沉淀细胞，弃上清。再加入1 ml JC-1染色缓冲液(1×)

重悬细胞，1000 rpm/min 4°C 离心5 min沉淀细胞，弃上清。

8）. 再用适量JC-1染色缓冲液（1×）重悬后，用流式细胞仪检测线粒体膜电位，记录激发波长488 nm处的FL1和FL2。

#### **1.2.13** 统计分析

采用Origin 7.0对数据进行分析作图。结果统计分析采用非配对t检验，或单因素方差分析和Student-Newman-Keuls (用于多重比较)，P﹤0.05认为有统计学意义。实验结果采用mean±SEM 表示。

## **2** 结果

### **2.1** **T-**钙通道在人类白血病细胞株和人外周血单个核细胞的表达

我们首先利用RT-PCR 技术研究了T-型钙通道在白血病细胞株MOLT-4、Jurkat、

Ball、HL-60、NB4、HEL、K-562和U937的表达。如图1.1A所示，除了HEL和U937细胞，其他白血病细胞在mRNA水平都有T-型钙通道α1亚单位的表达，有的仅表达α1G亚单位(Jurkat、Ball、HL-60、NB4)，有的细胞同时表达α1G和α1I亚单位(K-562), 而有的细胞同时表达三种亚单位，即α1G、α1H、α1I (MOLT-4)。我们进一步利用定量

PCR技术研究MOLT-4、Jurkat、Ball、U937细胞和人类正常外周血单个核细胞T-型钙通道的表达。结果如表1.2所示，α1H在MOLT-4细胞表达量相对较高，其他细胞的α1亚单位表达量较弱或者是阴性表达；另外，人类正常外周血单个核细胞不表达T-型钙通道。为了从蛋白水平验证T-型钙通道的表达，我们采用了western blot和细胞免疫荧光技术。在MOLT-4细胞我们检测到Cav3.1（较弱）和Cav3.2两种亚单位，分子量约为260

kD；而在Jurkat细胞我们只检测到Cav3.2亚单位的表达，且表达量较弱（图1.1B）。另外，免疫荧光结果表明在MOLT-4细胞Cav3.2主要表达于细胞膜；而在Jurkat细胞没有检测到阳性荧光信号，即没有检测到T-型钙通道的表达，这可能是由于T-型钙通道表达量较弱，造成荧光信号太弱，从而无法检测到（图1.2）。

Table 1.2 Q-RT-PCR detected T-type Ca2+ channels expression on MOLT-4, Jurkat, Ball, U937 cell lines and PBMCs (△Ct).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
| Target | MOLT-4 | Jurkat | Ball | U937 | PBMCs |
| α1G | 14.81±0.57 | 14.37±0.25 | 15.21±0.27 | NA, Ct＞40 | NA, Ct＞40 |
| α1H | 10.69±0.43 | 12.60±0.39 | NA, Ct＞40 | NA, Ct＞40 | NA, Ct＞40 |
| α1I | 17.55±0.66 | NA, Ct＞40 | NA, Ct＞40 | NA, Ct＞40 | NA, Ct＞40 |



Figure 1.1 Expression of T-type Ca2+ channels in human leukemic cell lines. (A) RT-PCR expression analysis of T-type Ca2+ channelα1-subunits in human leukemic cell lines. α1G: 35 cycles, α1H: 35 cycles, α1I: 37 cycles. (B) The protein expression levels of T-type Ca2+ channel

α1-subunits (Cav3.1 and Cav3.2) in MOLT-4 and Jurkat cells were determined by Western blot analysis. Right panel showed relative protein expression levels of Cav3.1 and Cav3.2 compared to GAPDH. (C) T-type Ca2+ currents recorded in a MOLT-4 cell before and after application of 2

µM NNC-55-0396 in 20 mM Ba2+-containing bathing solution. The holding potential was -80 mV

And the test potential was 0 mV. NNC, trace recorded 5 min after 2µM NNC-55-0396 was perfused into the bath.



Figure 1.2 Immunofluorescence detecting T-type calcium channels in MOLT-4 and Jurkat cells. Cells were probed with antibodies to the Cav3.1, Cav3.2 as indicated in the bottom panel. T-type calcium channels immunostaining (green) was compared with the localization of nucleus (blue), stained by DAPI.

为了研究T-型钙通道在MOLT-4细胞的功能表达，我们利用全细胞膜片钳技术记录T-型钙电流。同时为了减少钙电流的“run down”现象，细胞外液用钡离子替代钙离子，并把钡离子浓度提高到20 mM（为了增大钡电流）。该电流激活电压阈值为-30 mV，在 0

mV电流达到峰值，呈现出快速激活和失活动力学特征；MOLT-4细胞T-型电流的幅度在10 - 20 pA之间(n = 8)，平均电流密度为0.69±0.15 pA/pF (图1.3)。图1.1C所示，当细胞钳制在-80 mV，刺激电压为0 mV时，诱发出大约15 pA的钡电流（T-型钙电流）；

当用含有2µM的NNC-55-0396外液灌流时，该电流被抑制约70%。另外，MOLT-4细胞的平均静息膜电位为-30.5±1.8 mV (n = 12)，平均膜电容为14.5±0.7 pF (n = 15). T-型钙通道阻断剂米贝拉地尔可以阻断Jurkat细胞的钙内流（图1.4A）。以上结果表明T-型钙通道在人类急性T淋巴细胞性白血病细胞的钙内流机制中扮演着重要的角色。



Figure 1.3 Electrophysiological recordings from MOLT-4 T cells. (A) Traces showing typical recording of the T-type Ca2+ current (Ba2+ current) triggered from a holding potential of -80 mV to 30 ms-long depolarizing steps at -60 to +30 mV (10 mV increments) with an interpulse interval of 2 s in 20 mM Ba2+-containing bathing solution. (B) A plot of the current-voltage relationship for the Ca2+ current recorded as detailed in (A).



Figure 1.4 Effect of T-type Ca2+ channel antagonist, mibefradil on intracellular Ca2+ levels in Jurkat T cells. Jurkat T cells stained with Fluo-4 were preincubated with 0.5-10µM mibefradil in the presence (A) or absent (B) of extracellular Ca2+. For each sample, after the 10 min treatment with different concentrations of mibefradil baseline Ca2+ measurements were taken, cells were

Then stimulated at the 2 min mark with 10µg/ml soluble anti-CD3 monoclonal antibody (mAb), OKT3 to activate Ca2+ influx and (or) Ca2+ realease, and the analysis was immediately resumed. Results are representative of 3 independent experiments.

尽管我们的研究结果表明T-型钙通道阻断剂米贝拉地尔可以抑制T淋巴细胞性白血

病细胞的钙内流，但是我们想更进一步了解T-型钙通道阻断剂是部分还是全部阻断了T淋巴细胞性白血病细胞的钙内流，这可以帮助我们了解在T淋巴细胞性白血病细胞的激活过程中T-型钙通道是否是钙内流的唯一途径，还是另有其他离子通道参与了该过程的钙内流。带着这个问题，我们比较了在细胞外有钙并加入T-型钙通道阻断剂米贝拉地尔（10

µM）时的钙内流与胞外无钙时钙内流的区别。前期有研究表明10µM米贝拉地尔可以完全阻断膜去极化激活的钙内流[26]。当细胞外无钙时，利用抗-CD3单克隆抗体激活Jurkat

T淋巴细胞，可以诱发出一种快速、瞬时的（脉冲式）胞内钙浓度变化，这种钙浓度的变化起源于胞内钙库的释放（图1.4B）；然而，当胞外有钙并加入10µM米贝拉地尔时，这种瞬时的钙波动并没有出现（图1.4A, Gray line），这种现象说明T-型钙通阻断剂米贝拉地尔仅能抑制部分胞外钙内流。为了进一步验证这个问题，我们研究了L-型钙通道激动剂，(+/-) Bay K 8644对MOLT-4和Jurkat细胞胞内钙水平的影响。试验结果表明(+/-) Bay K 8644可以引起Jurkat细胞产生一种持续的胞内钙浓度升高（数据没有显示）。以上结果表明在T淋巴细胞性白血病细胞（或T淋巴细胞）激活过程中，由L-型钙通道介导的钙内流也发挥着重要的作用，这与Kotturi等报道的结果一致[27]。然而我们试验结果发现(+/-) Bay K 8644并不能引起MOLT-4细胞胞内钙浓度的变化。

### **2.2** **T-**型钙通道拮抗剂抑制人急性淋巴细胞性白血病细胞的活力

由于前期报道T-型钙通道参与细胞的增殖，所以我们想研究T-型钙通道拮抗剂，米贝拉地尔和NNC-55-0396对人急性淋巴细胞性白血病细胞活力的影响。如图1.5所示，米贝拉地尔和NNC-55-0396可以浓度依赖性地抑制MOLT-4和Jurkat细胞的活力。为了验证米贝拉地尔和NNC-55-0396对T-型钙通道作用的特异性，我们另外研究了米贝拉地尔和NNC-55-0396对不表达T-型钙通道U937细胞活力的影响，结果表明米贝拉地尔和NNC-55-0396对U937细胞的生长没有影响（图1.5C）。以上结果表明米贝拉地尔和NNC-55-0396是通过拮抗T-型钙通道而发挥其抗肿瘤（急性淋巴细胞性白血病）细胞生长的作用。

为了更进一步地验证T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞增殖中的作用，我们采用了小分子RNA干扰技术来敲除T-型钙通道，进而证明T-型钙通道的作用。我们通过设计与T-型钙通道α1G/H互补的小分子发卡RNA来抑制T-型钙通道的表达，敲除效率通过定量PCR技术验证（图1.6B）。结果如图1.6A所示，scrambled-shRNA组和对照组相比细胞增殖没有显著差异，然而shRNA-transduced组较scrambled-shRNA组及对照组细胞增殖速度显著下降。这些结果表明T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞增殖中发挥着重要的作用。

综合以上结果，T-型钙通道参与了急性淋巴细胞性白血病细胞的增殖。



Figure 1.5 Effect of T-type Ca2+ channel blockers, mibefradil and NNC-55-0396 on cell growth. MOLT-4 (A), Jurkat (B) and U937 (C) cells were cultured in the present of mibefradil or

NNC-55-0396 (2-10µM) for 48 h. All data points represent an average of three to five experiments (±SEM). \*P<0.05 versus control, \*\*P<0.01 versus control.



Figure 1.6 Effect of shRNA-induced Cav3.1/Cav3.2-gene silencing on MOLT-4 cell growth. (A) Transduction of shRNA into the MOLT-4 cells was achieved by a lentiviral infection method according to the manufacturer's instructions. Cell growth was observed after 48 h growth in normal, shRNA-transduced, and scrambled-shRNA infection control group. (B) Q-PCR analysis of the level of Cav3.1/Cav3.2 knockdown. Data are mean±SEM of three independent experiments in triplicates. \*\*P<0.01 versus scrambled-shRNA control group.

### **2.3** 米贝拉地尔和**NNC-55-0396**通过细胞周期阻滞和细胞凋亡两种途径抑制急性淋巴细胞性白血病细胞的生长

细胞生长的抑制可能归因于、或者部分归因于细胞周期的阻滞。为了研究米贝拉地尔和NNC-55-0396对细胞周期的影响，我们进行了细胞周期实验。试验结果表明米贝拉地尔和NNC-55-0396不仅抑制细胞增殖速率，而且诱导细胞凋亡。MOLT-4细胞在含有米贝拉地尔或NNC-55-0396 的培养基中生长48 h 后，G0/G1 期细胞的比例显著增加，而S期的细胞比例显著降低（图1.7B, 1.7C）。另外，T-型钙通道拮抗剂米贝拉地尔和NNC-55-0396能够显著增加亚G1期（凋亡细胞）的细胞比例。然而对于Jurkat细胞，米贝拉地尔和NNC-55-0396 主要诱导细胞凋亡（亚G1期细胞比例显著增加）（图1.7A，

1.7C）. T-型钙通道拮抗剂米贝拉地尔和NNC-55-0396对MOLT-4和Jurkat细胞周期的不同影响可能是因为两种细胞T-型钙通道的表达量不同所造成的。为了进一步验证米贝拉地尔和NNC-55-0396对细胞的毒性作用，我们进行了细胞凋亡实验。结果显示二者可以显著诱导细胞凋亡（图1.7D, 1.7E）。另外，从形态学上也观察到米贝拉地尔和NNC-55-0396 可以诱导细胞凋亡，表现为细胞固缩、染色质聚集（数据没有显示）。

以上结果表明米贝拉地尔和NNC-55-0396对细胞活力具有双重作用：（a）抑制细胞增殖；（b） 诱导细胞凋亡。



Figure 1.7 Effect of T-type Ca2+ channel antagonists, mibefradil (Mib) and NNC-55-0396 (NNC), on the cell cycle distribution and cell apoptosis of Jurkat and MOLT-4 cells. (A-C) Each cell was treated with different concentrations (0, 5 or 10µM) of mibefradil or NNC-55-0396 for 48 h. To acquire enough cells for cell cycle analysis, Jurkat cells were treated with 8µM NNC-55-0396. Cell cycle phase was determined using flow cytometry (FACS). (D-E) Cells were stained with

Annexin V (FITC) and propidium iodide (PI) after treatment with 10µM mibefradil or NNC-55-0396 for 48 h (except Jurkat cells subjected to NNC-55-0396 for 24 h). Flow cytometry profiles represent annexin V-FITC staining in x-axis and PI in y-axis for the three experimental conditions. Percentage of each LR and UR area represents Annexin V-positive/PI-negative (early apoptotic) and Annexin V-positive/PI-positive cells (late apoptotic), respectively. Mibefradil and NNC-55-0396 had a dual effect on cell viability: (a) reducing the proliferation rate; and (b) increasing cell apoptosis. (C and E) Histogram bars representing the mean±SEM of three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 versus control group. Statistical significances were determined using one factor ANOVA and Student-Newman-Keuls post-test.

### **2.4** 米贝拉地尔和**NNC-55-0396**下调**MOLT-4**细胞的**ERK**信号通路

前期报道认为Ca2+ 在T淋巴细胞与MAPK信号通路有着密切的联系[27, 28, 29]，

MAPK信号通路在调节细胞周期进程中发挥着重要的作用。为此，我们选择MOLT-4细胞研究了T-型钙通道拮抗剂，米贝拉地尔和NNC-55-0396是否可以调节p44/42 MAP激酶的表达。结果如图1.8B, 1.8C所示，除了NNC-55-0396可以引起ERK1/2 的磷酸化瞬时增强外，米贝拉地尔和NNC-55-0396可以持续地抑制ERK1/2的磷酸化。另外，实验结果表明米贝拉地尔和NNC-55-0396可以浓度依赖性地抑制ERK1/2 的磷酸化；但是10µM NNC-55-0396可以大大增强ERK1/2的磷酸化（图1.8A），这与10µM NNC-55-0396可以引起胞内钙超载的结果是相对应的（图1.9）。这些结果表明米贝拉地尔和NNC-55-03963可以通过影响胞内钙离子水平从而调节ERK1/2的磷酸化，进而调节急性淋巴细胞性白血病细胞的增殖。



Figure 1.8 T-type Ca2+ channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 modulated phospho-p44/42 MAP kinase activation in MOLT-4 cells. (A) MOLT-4 cells were incubated with different concentration of mibefradil or NNC-55-0396 for 48 h. (B-C) MOLT-4 cells were treated with 10µΜMibefradil or NNC-55-0396 for various time-points from 0 to 24 h. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Membranes were probed with a phosphospecific Ab to detect activated Erk1/2 (top panel). The membrane was stripped and reprobed with an Ab directed against Erk1/2 to detect the total amount of kinase loaded in each lane (middle panel). GAPDH was used as a loading control for each lane (bottom panel). The results are presented as mean±SEM of three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 compared with untreated control cells.



Figure 1.9 Effect of T-type Ca2+ channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 on intracellular Ca2+ levels in MOLT-4 T cells. Graphs show the effect of high concentration mibefradil and NNC-55-0396 on the intracellular baseline Ca2+ levels in the presence of extracellular Ca2+. Results are representative of 3 independent experiments.

### **2.5** **NNC-55-0396** 诱发内质网钙释放

胞内钙稳态的破坏是细胞损伤的一个早期事件[30, 31, 32]，另外，NNC-55-0396相对于米贝拉地尔有更强的细胞毒性，尤其对于Jurkat细胞。因此，我们利用流式细胞仪技术研究NNC-55-0396对Jurkat 细胞胞内钙水平的影响。图1.10B 表明NNC-55-0396 可以在胞外无钙的情况下浓度依赖性地增高胞内游离钙离子浓度；另外，在胞外有钙的情况下，

低浓度的NNC-55-0396 (＜5µM)可以降低胞内游离钙浓度，而高浓度的NNC-55-0396 (＞5µM)可以减弱或消除这种抑制作用（图1.10A）。更有意思的是，10µM NNC-55-0396可以引起持续性的钙超载（图1.10A, Green line）。事实上，高浓度的米贝拉地尔和NNC-55-0396 也会引起MOLT-4 细胞的钙超载（图1.9）。



Figure 1.10 Effect of T-type Ca2+ channel antagonist, NNC-55-0396 on intracellular Ca2+ levels in Jurkat T cells. (A) Jurkat cells stained with Fluo-4 were preincubated with 2.5-10µM NNC-55-0396 in the presence of extracellular Ca2+. For each sample, after the 10 min treatment with different concentrations of NNC-55-0396 baseline Ca2+ measurements were taken, cells were then stimulated at the 2 min mark with 10µg/ml soluble anti-CD3 monoclonal antibody (mAb), OKT3 to activate Ca2+ influx, and the analysis was immediately resumed. (B) Fluo-4 loaded Jurkat cells were treated with 2.5-10µM NNC-55-0396 and stimulated in the absence of extracellular Ca2+. Results are representative of 3 independent experiments.

由于内质网是胞内钙的主要钙库，且有报道认为T-型钙通道在连接钙内流与内质网钙库之间发挥着重要的作用[33]，所以我们提出这样一个假设：NNC-55-0396是否会引起内质网钙稳态的破坏，从而引起细胞凋亡。带着这个问题，我们首先研究了NNC-55-0396是否会改变Jurkat细胞对内质网Ca2+-ATP酶抑制剂-毒胡萝卜素(thapsigargin, TG) 的反应。结果如图1.11所示，TG诱导的内质网钙释放（胞内游离钙离子浓度的升高）可以被NNC-55-0396减弱。我们在MOLT-4细胞发现同样的现象（数据没有显示）。以上结果表明NNC-55-0396 可以引起内质网钙库的释放。



Figure 1.11 NNC-55-0396 exposure increased intracellular baseline Ca2+ levels via inducing ER calcium release. Jurkat T cells stained with Fluo-4 were preincubated with 1-10µM NNC-55-0396 in the absence of extracellular Ca2+. For each sample, after the 10 min pretreatment with different concentrations of NNC-55-0396 baseline Ca2+ measurements were taken, cells were then stimulated at the 2 min mark with 1µM thapsigargin (TG) to induce the endoplasmic reticulum (ER) Ca2+ release, and the analysis was immediately resumed. The results depicted are representative of three independent experiments.

线粒体是内质网钙信号最近的一个靶点[34]。有多篇报道证明了内质网-线粒体之间的钙流动在诱导细胞凋亡中作用的重要性[35]。因此我们想进一步研究NNC-55-0396诱导的内质网钙释放是否会引起线粒体膜电位的去极化，从而导致细胞凋亡。为此，我们首先研究了NNC-55-0396对Jurkat细胞线粒体膜电位的影响。结果如图1.12B所示，NNC-55-0396 处理Jurkat 细胞2 h后线粒体膜电位显著去极化（和对照组相比，P﹤

0.05)。



Figure 1.12 Effects of the mitochondrial uniporter antagonist RU360 and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor CsA on NNC-55-0396-induced cell apoptosis and depolarization of the mitochondrial membrane potential in Jurkat cells. (A) Live cells were examined by 2 parameters: forward scatter/side scatter (FSC/SSC) index of live cells in cell size and granularity by FACScan. Cells were preincubated with mitochondrial calcium uptake (Ru360, 20µM) or mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor (cyclosporine A [CsA], 1

µM）for 1 h, then incubated for 6 h in the presence of 10µM NNC-55-0396. (B) Cells were preincubated with mitochondrial calcium uptake (Ru360, 20µM) or mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor (CsA, 1µM) for 1 h, then incubated for 2 h in the presence of 10

µM NNC-55-0396. Then the mitochondrial membrane potential was determined by FACS.

Results are presented as mean±SEM of four independent experiments. \*\*p <0.01 versus control group (-) NNC-55-0396, ## p <0.01 versus control group (+) NNC-55-0396, \*p <0.05 versus control group.

为了研究NNC-55-0396引起的线粒体膜电位去极化是否起源于内质网的钙释放，从而破坏线粒体的钙稳态。我们首先用Ru360 (20µM，线粒体钙摄入抑制剂)和环孢素A (CsA, 1µM，线粒体膜通透性转运孔抑制剂)预处理Jurkat细胞1 h，然后再加入NNC-55-0396，结果表明这两种与钙转运相关的抑制剂并不能保护线粒体膜电位的去极化（图1.12B）。另外，这两种抑制剂对细胞活力也没有保护作用（图1.12A）；相反，环孢素A能够增强NNC-55-0396对Jurkat细胞的毒性，这可能归因于环孢素A对神经钙素的抑制作用。事实上，Ru360和环孢素A对MOLT-4细胞的线粒体膜电位和细胞活力也没有任何保护作用（图1.13）。

以上结果表明NNC-55-0396引起线粒体膜电位的去极化不能直接归因于内质网的钙释放。



Figure 1.13 Effects of the mitochondrial uniporter antagonist RU360 and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor CsA on NNC-55-0396-induced cell apoptosis and depolarization of the mitochondrial membrane potential in MOLT-4 cells. (A) Live cells were examined by 2 parameters: forward scatter/side scatter (FSC/SSC) index of live cells in cell size and granularity by FACScan. Cells were preincubated with mitochondrial calcium uptake (Ru360, 20µM) or mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor (cyclosporine A [CsA], 1

µM）for 1 h, then incubated for 12 h in the presence of 10µM NNC-55-0396. (B) Cells were preincubated with mitochondrial calcium uptake (Ru360, 20µM) or mitochondrial permeability transition pore (mPTP) inhibitor (CsA, 1µM) for 1 h, then incubated for 8 h in the presence of 10

µM NNC-55-0396. Then the mitochondrial membrane potential was determined by FACS.

Results are presented as mean±SEM of four independent experiments. \*\*p <0.01 versus control group (-) NNC-55-0396, \*p <0.05 versus control group.

## **3** 讨论

本实验的研究得出如下结论：（i）人类白血病细胞有T-型钙通道的表达；(ii) T-型钙通道阻断剂-米贝拉地尔和NNC-55-0396不仅能够抑制细胞增殖，而且能够诱导细胞凋亡；（ⅲ）米贝拉地尔和NNC-55-0396破坏细胞内钙稳态，部分归因于内质网的钙释放；

（ⅳ）米贝拉地尔和NNC-55-0396下调MOLT-4细胞的ERK信号通路。我们的研究结果表明T-型钙通道有可能成为治疗急性淋巴细胞性白血病的一个新靶点。

前期报道认为肿瘤细胞的增殖对胞外钙离子浓度的降低不敏感[36]。肿瘤细胞的钙信号经常失调，更为重要的是电压门控钙通道在肿瘤细胞的钙稳态重塑中扮演着重要的角色。另外，研究发现多种类型肿瘤细胞会有T-型钙通道的异常表达上调[37]，这些研究结果表明T-型钙通道在肿瘤的发生发展中扮演着重要的角色。

膜片钳结果显示MOLT-4细胞的T-型钙电流激活电压阈值为-30 mV，峰值电压为0 mV，与前期的报道结果不一致[12, 14, 38]，这可能归因于研究所用的细胞株不同，因为不同的细胞由于T-型钙通道表达亚型或其他因素不同，T-型钙电流的电生理学特征也不尽相同。实验中采用电流钳模式记录到MOLT-4细胞的静息膜电位为-30.5±1.8 mV；流式实验结果表明急性T淋巴细胞性白血病细胞在静息状态下存在背景性的钙内流，并且可以被T-型钙通道拮抗剂抑制。以上结果表明在静息状态下急性T淋巴细胞性白血病细胞存在T-型钙通道“窗电流”，从而满足细胞周期进程对钙离子的需求。

我们实验中发现仅在大约不到8%的MOLT-4细胞中记录到小幅度的T-型钙电流。前期研究结果表明淋巴细胞在激活时钙离子浓度的变化速率仅有50 nmol/s [39, 40, 41]，这与我们的研究结果一致。考虑到胞内的钙缓冲和淋巴细胞的胞质容积非常小，可以据此推断出每秒有大约5000-25,000 离子通道开放或10,000–50, 000 基础电荷流动[40]。根据

法拉第常数测算得到的电流幅度大概为1.6-8×10-15 C/s或1.6-8×10-3 pA。目前的技术无法记录到如此小的电流。

多篇体外系统研究结果表明T-型钙通道拮抗剂抑制肿瘤细胞的增殖和活力[42]。另外，T-型钙通道拮抗剂米贝拉地尔可以诱导乳腺癌细胞[43] 和恶性胶质瘤细胞凋亡[11]。

这些研究结果表明T-型钙通道可以作为细胞生存和（或）凋亡信号的一个调控因素。本研究发现抑制T-型钙通道能够显著降低Jurkat和MOLT-4细胞的生长速度，而T-型钙通道拮抗剂-米贝拉地尔和NNC-55-0396对不表达T-型钙通道的U937细胞生长没有影响。这些结果表明T-型钙通道的表达与细胞的生长存在密切的联系。然而，令人惊奇的是，实验结果显示T-型钙通道低表达的Jurkat细胞比T-型钙通道高表达的MOLT-4细胞表现出对T-型钙通道拮抗剂更高的敏感性，尤其是对NNC-55-0396的敏感性。这种现象可能归因于NNC-55-0396在Jurkat细胞中诱导钙库的钙释放，从而引起更多的细胞死亡。另外，Jurkat细胞孵育NNC-55-0396后表现为细胞周期中亚-G1期所占的细胞比例非常高，说明除了抑制T-型钙通道，NNC-55-0396的内源性毒性也扮演着重要的角色。细胞周期分析表明米贝拉地尔和NNC-55-0396对细胞活力具有双重作用：（i）抑制细胞增殖；(ii)诱导细胞凋亡。图1.7C表明米贝拉地尔和NNC-55-0396通过阻滞G1-S期转换抑制MOLT-4 细胞的增殖。

实验结果表明2µM NNC-55-0396可以抑制大约70%的T-型钙电流，而2µM NNC-55-0396 仅能抑制不到10%的细胞增殖速率，这种现象可以归因于以下两个方面。

（ⅰ）电生理记录是在生理盐溶液进行的，里面不含有BSA和其他可以结合T-型钙通道阻断剂的蛋白，所以不会降低T-型钙通道阻断剂的有效浓度。而细胞增殖实验是在RPMI

1640培养基里进行的，里面含有包括BSA在内的等多种蛋白，可能会结合T-型钙通道阻断剂，从而降低其有效浓度。（ⅱ）除了T-型钙通道，其他离子通道如L-型钙通道、钙释放激活钙通道等在细胞增殖所需钙离子中也扮演着重要的角色。因此，抑制细胞增殖所需的T-型钙通道阻断剂浓度大于阻断T-型钙电流所需的浓度，且T-型钙通道阻断剂仅能部分地抑制细胞增殖。

钙离子是调节细胞周期的一个重要因素，它对于细胞增殖是不可或缺的离子。例如，G1-S期的转换和G2-M期的转换都依赖于Ca2+/钙调蛋白-依赖性激酶II [44]。在增殖期的细胞，钙信号经常以钙震荡的形式出现-通过胞外钙内流和胞内钙库的释放。T-型钙通道由于其独特的电生理学特征-低电压激活、快速失活、“窗电流”，非常适合参与这种钙震荡。事实上，许多类型的增殖细胞包括一些肿瘤细胞都能够记录到T-型钙电流[37, 42]。如图1.4和图1.10所示，利用小分子阻断剂抑制T-型钙通道可以降低细胞内游离钙离子浓度，说明T-型钙通道在维持细胞内钙稳态发挥着重要的作用。

米贝拉地尔一直被认为是T-型钙通道的特异性阻断剂，并被多篇报道作为工具药来研究T-型钙通道与细胞增殖的关系。然而，有报道认为米贝拉地尔抑制细胞增殖与细胞肿胀、抑制体积敏感性氯通道[45, 46]或其他离子通道有关[47, 48, 49]。Son等报道认为NNC-55-0396可以抑制兔冠状动脉平滑肌细胞的电压依赖性钾通道[50]。因此，把这些非特异性T-型钙通道阻断剂抑制细胞增殖的作用归因于其抑制T-型钙通道的结果要非常谨慎。

通常情况下，破坏细胞的钙稳态与细胞凋亡关系非常密切[51]。例如，长时间的、大幅度的钙离子水平改变（钙俯冲或钙超载）会导致细胞死亡。那么，问题就产生了，为什么抑制T-型钙通道（抑制钙内流）反而会引起急性淋巴细胞性白血病细胞凋亡呢？可以用来解释这种现象的依据就是胞质内钙离子的增加不仅可以来源于胞外的钙内流，还可以来源于胞内钙库的释放。如图1.10B和图1.11所示，NNC-55-0396可以通过诱导内质网的钙释放引起胞内钙超载。另外，高浓度的米贝拉地尔（≥10µM）也会引起胞内钙超载

（图1.9）。这些结果与前期报道一致：在大鼠心肌成纤维细胞和人类血小板中高浓度的米贝拉地尔（≥10µM）会通过IP3受体操纵的钙库诱导钙释放[52]。Das等在黑色素瘤细胞中研究表明米贝拉地尔和pimozide 会引起内质网压力，抑制自嗜，导致细胞凋亡性死亡[53]。

Valerie等报道认为抑制T-型钙通道的功能可以抑制mTORC2/Akt促生存信号通路并诱导细胞凋亡[11]。以上数据表明抑制剂的特异性和研究模型的特征共同决定了细胞对阻断T-型钙通道的最终反应-细胞周期阻滞、细胞凋亡、自嗜、坏死还是多种结果共同存在。

内质网和线粒体是管控胞内钙流动和决定细胞命运的两个重要亚结构。另外，线粒体是内质网钙信号最近的一个靶点。因此我们研究了线粒体在T-型钙通道阻断剂抑制细胞生存中可能发挥的作用。众所周知，线粒体暴露在高钙的环境下会导致肿胀和失去耦联，从而失去维持细胞生存所需ATP水平的能力，最终导致细胞坏死[54]。在我们的研究中，Ru360（线粒体钙摄入抑制剂）和环孢素A（线粒体膜通透性转运孔抑制剂）对NNC-55-0396的毒性作用没有任何保护作用，表明线粒体的钙摄入（钙稳态破坏）没有在我们的模型中发挥作用。另外，内质网压力-内质网的慢性钙耗竭是导致细胞死亡的一个重要信号。Das等报道表明利用小分子拮抗剂抑制T-型钙通道或利用RNA干扰技术敲除T-型钙通道会激活IRE1通路（XBP-1s 表达增加）和PERK通路，或者非折叠蛋白反应ATF6通路(GADD153) [53]。因此内质网压力可能在我们模型中诱导细胞凋亡发挥着

重要的作用。由于Ca2+离子与MAPK信号通路有着密切的联系，我们还研究了米贝拉地尔和NNC-55-0396是否能够调节MAP激酶的活性。研究结果表明米贝拉地尔和NNC-55-0396能够下调MOLT-4细胞的ERK信号通路，与Kotturi报道的结果（抑制钙内流降低ERK1/2的磷酸化）一致[27]。由于ERK1/2信号通路在调节细胞增殖中发挥着重要的作用，因此抑制ERK1/2信号通路可能与米贝拉地尔和NNC-55-0396抑制细胞增殖相关。

本研究从分子和药理上证明了白血病细胞表达T-型钙通道。T-型钙通道拮抗剂米贝拉地尔和NNC-55-0396对细胞生长具有双重作用：（i）抑制细胞增殖；(ii)诱导细胞凋亡。通过研究其分子机制发现这两种T-型钙通道拮抗剂可以诱导内质网钙释放和破坏

ERK1/2信号通路。根据我们的研究结果和其他的体内研究报道，我们认为T-型钙通道拮抗剂在将来有可能成为治疗一些肿瘤（T-型钙通道表达阳性）的有效途径。

# 第二章 电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的表达与功能研究

前**言**

在淋巴细胞已经发现有多种离子通道表达，如电压门控钾通道(KV1.3) [55, 56, 57]、钙激活钾通道(KCa) [58, 59]、钙释放激活钙通道(CRAC) [60, 61]、肿胀激活氯通道(Clswell) [62]。离子通道的表达水平在人类T淋巴细胞发育、激活以及分化为效应细胞过程中变化非常显著[63] 。

为了能够发挥有效的免疫反应，T淋巴细胞和B淋巴细胞必须迁移到靶组织，这依赖淋巴细胞的运输[64]。这种“归巢”进程最终能把募集到的免疫效应细胞运输到抗原或微生物侵袭的组织器官中去。血液循环系统里的淋巴细胞是圆形、非运动性细胞，在炎症反应过程中它们需要重塑细胞支架和细胞器来获得具有改变细胞形态（极化性形态学）的能力[65]。然而，这种反应的机制目前尚不清楚。越来越多的数据表明肿瘤细胞的迁移受电压门控钠通道的调控[66, 67, 68, 69, 70, 71, 72]。另外，电压门控钠通道特异性阻断剂河豚毒素

（TTX）能够在体外系统抑制多种与迁移相关的细胞行为[67, 68, 69, 70, 71, 72]。有意思的是，有学者已经把淋巴细胞的运输与肿瘤细胞的迁移进行了比较，认为这两种行为具有非常相似的特征[73, 74]。因此，研究淋巴细胞电压门控钠通道的表达与功能将有助于了解淋巴细胞在免疫反应中所起的作用。

传统上认为免疫细胞是非兴奋性细胞。然而，当它们被激活后，由于离子通道表达的改变以及胞内钙库的动员，会拥有一些兴奋性细胞的电生理学特征。人类T淋巴细胞表达电压门控钠通道，并受到严格的调控[69]，但是他们的分子特征和功能目前尚不清楚。电压门控钠通道有一个α主要亚单位(250-260 kDa)和若干个β(30-40 kDa)附属亚单位组成[75]。至今为止，在哺乳类动物至少发现9种编码电压门控钠通道α亚单位的基因(Nav1.1-Nav1.9, 编码基因为SCN1A-SCN11A) [75]。根据它们对TTX的敏感性可以分为TTX-敏感性钠通道（TTX-S: Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 和Nav1.7，nM 的

TTX可以阻断此类钠通道）和TTX-抵抗性钠通道(TTX-R: Nav1.5, Nav1.8和Nav1.9, 需要µM 的TTX才可以阻断此类钠通道)。

尽管已经有报道表明淋巴细胞表达电压门控钠通道，但是他们的分子特征和表达亚型仍然不是很清楚。另外，关于电压门控钠通道在淋巴细胞中功能的研究报道更少。本课题研究的主要目的为：（i）揭示电压门控钠通道α亚单位在淋巴细胞的分子特征；(ii)探讨电压门控钠通道在淋巴细胞侵袭中作用。我们的研究将有助于揭示淋巴细胞转运的机制。

## **1** 实验材料和方法

### **1.1** 材料

#### **1.1.1** 标本和细胞株

临床外周血标本采集时间为2013年6月，分别收集8例健康男性和8例健康女

性外周血5-10 ml，遵守国家人体试验委员会所制定的伦理学标准，并征得受试者的同意。MOLT-4细胞株（急性淋巴母细胞白血病细胞）购买于美国ATCC公司，Jurkat（急性T淋巴细胞白血病细胞）和Ball（急性B淋巴细胞白血病细胞）为本实验室保存。

#### **1.1.2** 主要仪器及产地

倒置显微镜IX-70: OLYMPUS公司

荧光倒置显微镜Ti-U: Nikon公司

二氧化碳培养箱CCL-170B-8: ESCO公司

二氧化碳培养箱CB150: Binder公司台式高速冷冻离心机UNIVERSAL 32R: Hettich公司台式高速离心机UNIVERSAL 320: Hettich公司

台式高速离心机ROTINA 420: Hettich公司

手掌型离心机LX-100：江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

脱色摇床TS-2:江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

脱色摇床TS-92:江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

电热恒温水浴锅DK-S22:上海精宏实验设备有限公司

纯水仪VPW-10N:北京历元电子仪器公司

数控超声波清洗器KQ-50DE：昆ft市超声仪器有限公司

酸度计DELTA 320: METTLER公司

洁净工作台SW-CJ-2F：苏净安泰公司

半自动凝胶图像分析仪 GDS-8000: ULTRO-VIOLET 公司超低温冰箱 ULT1386-7－V14: REVCO 公司

微型垂直电泳系统PowerPac200: Bio-RAD公司

电泳槽DYY-Ⅲ33B：北京市六一仪器厂

高电流电泳仪PowerPac HC: Bio-rad公司

基础电泳仪PowerPac Dasic: Bio-rad公司

小型垂直电泳槽：Bio-rad公司

半干转印系统：Bio-rad公司

电子天平AE240: METTLER公司

X线射影暗匣XJX-Ⅲ：上海跃进以用光学器械厂

流式细胞仪Accuri C6: BD公司

普通PCR仪Pro S: Eppendorf公司

凝胶成像系统：Bio-rad公司

微量移液器：Eppendorf公司

定量PCR仪CFX96: Bio-rad公司

微电极拉制仪P-97: Sutter公司

电极抛光仪CPM-2: ALA公司

四通道灌流系统BPS-4: ALA公司

膜片钳放大器200B: Axon公司

数模/模数转换器Digidata 1320A: Axon公司

手动显微操作器MP-285: Sutter公司

蠕动泵BT00-100M:保定兰格恒流泵有限公司

防震台： TMC 公司

酶标仪SpectraMax M3: MD公司

制冰机: SANYO DENKI公司

恒温烤箱: SANYO DENKI公司

#### **1.1.3** 主要试剂及生产厂商

胎牛血清： Gibco 公司

1640培养基：Gibco公司(不含HEPES)

双抗： MP 公司

DMSO: Sigma-Aldrich公司

淋巴细胞分离液：[天津市灏洋生物制品科技有限责任公司](http://www.docin.com/p-586896003.html)

RNA提取试剂盒：天根生化科技有限公司

反转录试剂盒：Promega公司

DNA Marker：天根生化科技有限公司

PCR Mix: 康为世纪

PCR引物：Invitrogen公司，上海生工公司

琼脂糖：AGAROSE公司

SYBR Green PCR Mix: Takara公司

SYBR GreenⅠ：[北京百泰克生物技术有限公司](http://www.biomart.cn/bioteke/index.htm)

Loading buffer：南京凯基生物科技发展有限公司

DNA marker：南京凯基生物科技发展有限公司

RIPA裂解液（强）：碧云天公司

PMSF晶体：碧云天公司

BCA蛋白定量试剂盒：碧云天公司

5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液： 碧云天公司

SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒：碧云天公司

预制胶：上海文渊阁生物科技有限公司

预染蛋白彩色Marker: Thermo公司

丽春红染色液：碧云天公司

封闭液：武汉博士德生物工程有限公司

一抗稀释液：碧云天公司

Tween-20: Amresco公司

Pan anti- Nav: Alomone Labs公司

anti-GAPDH：杭州贤至生物科技有限公司

二抗稀释液：碧云天公司

辣根过氧化物酶标记兔二抗：Santa Cruz公司

ECL化学发光试剂盒：Advansta公司

显影粉、定影粉：天津市世纪奥博商贸有限公司

PBS: Hyclone 公司

多聚甲醛: Sigma-Aldrich公司

聚左旋赖氨酸：Sigma-Aldrich公司

Triton-X100：厦门泰京有限公司

BSA牛血清白蛋白：厦门泰京有限公司

FITC标记兔二抗：Santa Cruz公司

DAPI：碧云天公司

TTX: Sigma-Aldrich公司

细胞增殖检测试剂盒：Promega

甘氨酸：Biosharp公司

Tris base: VETEC 公司

SDS: Sigma-Aldrich公司

#### **1.1.4** 主要耗材及生产厂家

15 ml无菌离心管：Corning公司

50 ml无菌离心管：Corning公司

6孔培养板：Corning公司

12孔培养板：Corning公司

24孔培养板：Corning公司

96孔培养板：Corning公司

培养皿：Corning公司

细胞培养瓶：Corning公司

Transwell小室：Corning公司

96 孔PCR 板： Bio-rad 公司

8 连管： Roche 公司

200 µl 无RNA 酶EP 管： Axygen 公司

0.6 ml 无RNA 酶EP 管： Axygen 公司

1.5 ml 无RNA 酶EP 管： Axygen 公司

10 µl 无RNA 酶枪头： Axygen 公司

200µl无RNA酶枪头：Axygen公司

1 ml 无RNA 酶枪头： Axygen 公司

医用X射线胶片柯达X-OMAT：锐珂（厦门）医疗器械有限公司

滤纸：Bio-rad公司

PVDF膜：Millipore公司

细胞爬片：Thermo fisher公司

常规枪头：碧云天公司

常规EP 管： 碧云天公司

医用棉球：[新乡市予蒲医用卫生材料厂](http://www.mychemy.com/home/yupu1274969566)

医用酒精：利尔康公司

#### **1.1.5** 溶液的配置细胞冻存液：

93% FBS, 7% DMSO，预冷。

细胞培养基：

10% FBS +1640培养基+ 1%双抗。

1.0 mol/L Tris·HCl：

Tris (121.14) 30.29 g

双蒸水200 ml

用浓盐酸调整pH值后加水至250 ml，高压灭菌后室温保存。

1.5 mol/L Tris·HCl (pH8.8)：

Tris (MW 121.14) 45.43 g

双蒸水200 ml

用浓盐酸调整pH值至8.8，最后加水至250 ml，高压灭菌后室温保存。

0.5 mol/L Tris·HCl (pH6.8)：

Tris (MW 121.14) 15.14 g

双蒸水200 ml

用浓盐酸调整pH值至6.8，最后加水至250 ml，高压灭菌后室温保存

TE缓冲液(pH8.0)：

1 M Tris-HCl Buffer (pH8.0) 5 ml

0.5 M EDTA (pH8.0) 1 ml

向烧杯中加入约400 ml dd H2O均匀混合，将溶液定容到500 ml后，高温高压灭菌，室温保存。

DEPC水：

1000 ml双蒸水中加1 ml DEPC，放在1000 ml容量瓶中静置4 h后高压，室温保

存。

5×TBE（贮存液）：

Tris碱54 g

硼酸27.5 g

Na2EDTA·2H 2O (pH8.0) 3.72 g

加蒸溜水定容至1000 ml，室温保存。电泳液缓冲液：

Tris 3.03 g

甘氨酸18.77 g

SDS 1 g

加蒸馏水至定容至1000 ml，室温保存。转移缓冲液：

甘氨酸 2.9 g

Tris 5.8 g

SDS 0.37 g

甲醇200 ml

先用蒸馏水溶解甘氨酸、Tris 和SDS，然后再加入甲醇，最后加蒸馏水至1000 ml，溶解后室温保存。

5×SDS上样缓冲液：

0.5 mol/L Tris·HCl(pH6.8) 2.5 ml

二硫叔糖醇（DTT, MW154.5）0.39 g

SDS 0.5 g

溴酚蓝 0.025 g

甘油 2.5 ml

混匀后，分装于 1.5 ml 离心管中，4 °C 保存。

PBS缓冲液：

NaCl 10 g

KCl 0.25 g

Na2HPO4 1.44 g

KH2HPO4 0.25 g

用NaOH调整pH值至7.4，加蒸馏水定容至1000 ml。

TBS缓冲液：

## 1 mol/L Tris·HCl (pH7.5) 10 ml

NaCl 8.8 g

加蒸馏水定容至1000 ml。

TBST缓冲液：

20% Tween20 1.65 ml

TBS 700 ml

丽春红染色液：

丽春红S 0.1 g

乙酸0.1 ml

加蒸馏水定容至100 ml，室温保存。考马斯亮蓝染色液：

考马斯亮蓝R-250 1.25 g

甲醇227 ml

冰醋酸46 ml

将三者混合搅拌混匀，加入蒸馏水定容至500 ml。高甲醇脱色液：

甲醇227 ml

冰醋酸37.5 ml

两者混匀，然后加入蒸馏水定容至500 ml。通透剂：

Tritionx-100 50μl

PBS 10 ml

震荡混匀，隔周重配。台式液：

NaCl 8.19 g

KCl 0.4023 g

MgCl2.6 H2O 0.2033 g

CaCl2 0.222 g

HEPES 2.383 g

Glucose 1.9817 g

用NaOH调整pH值至7.4，最后加蒸馏水定容至1000 ml。正常电极内液：

K- aspartate 1.5408 g

KCl 0.298 g

MgCl2.6 H2O 0.02033 g

Na2ATP 0.1816 g

EGTA 0.3804 g

HEPES 0.2383 g

NaCl 0.0584 g

用KOH调整pH值至7.2，最后加蒸馏水定容至100 ml。钠记录液：

NaCl 7.5972 g

CsCl 1.684 g

CaCl2 0.1998 g

MgCl2 0.2032 g

HEPES 1.1915 g

Glucose 1.9817 g

CdCl2 0.1142 g

用NaOH调整pH值至7.4，最后加蒸馏水定容至1000 ml。钠内液：

HEPES 0.1192 g

CsCl 0.1684 g

CsOH. H2O 0.8397 g

L- aspartic 0.6656 g

EGTA 0.1902 g

TEA-Cl. H2O 0.0829 g

Na2ATP.3H2O 0.0363 g

Na3GTP 0.0147 g

Creatine phosphate.2Na.4H2O 0.0196 g

MgCl2.6 H2O 0.0203 g

用CsOH调整pH值至7.2，最后加蒸馏水定容至50 ml。

### **1.2** 方法

#### **1.2.1** 细胞培养、复苏及冻存

##### **1.2.1.1** 细胞培养与传代

MOLT-4、Jurkat和Ball细胞株培养于RPMI 1640培养基，含10% FBS、1%双抗。培养箱参数设置为5% CO2、37°C。根据细胞的生长状况每2-3 d换液1次。当细胞的密度达到2×106/ml 时，进行传代。传代时，收集细胞于15 ml无菌离心管中，1000

rpm/min离心3 min，倒掉上清液，用新鲜的细胞培养液重悬细胞，细胞悬液加入培养瓶中继续培养。

##### **1.2.1.2** 细胞复苏

1）. 超净台紫外消毒30 min。预先打开水浴锅，使温度在37°C 左右。

2）. 佩戴眼镜和手套，从液氮罐中取出冷冻管。

3）. 迅速放入37°C[水浴](http://www.ebioe.com/yp/product-list-56.html)中，并不停摇动，在1 min内使其完全融化，用酒精棉球擦拭消毒放入超净台。

4）. 加入适量培养液后接种[于培养瓶](http://www.ebioe.com/yp/product-list-984.html)中，置5% CO2、37°C细胞培养箱静置培养，次日更换一次培养液，继续培养，观察生长情况。大约1-2周细胞能够恢复到正常状态。

##### **1.2.1.3** 细胞冻存

1）. 选择处于对数生长期的细胞，在冻存前一天换液。将约5-10×106个细胞收集于[离心管](http://www.ebioe.com/yp/product-list-954.html)中离心，1000 rpm/min, 3 min。

2）. 去上清液，加入1 ml细胞冻存液(93% FBS + 7% DMSO)重悬细胞，把细胞悬液转入冻存管中，用封口胶封闭冻存管，标记好细胞名称和冻存日期，并作好登记（日期、细胞种类及代次、冻存支数）。

3). 采用下列步骤逐步降温：4°C 30 min→-20°C 1 h→-80°C 过夜→液氮。

#### 1.2.2 外周血单个核细胞分离方法同第一部分1.2.2。

#### **1.2.3** **RT-PCR** 和实时定量**PCR**

1.2.3.1**细胞总RNA提取（RNAsimple总RNA提取试剂盒）**方法同第一部分1.2.3.1.

1.2.3.2 **RNA纯度和浓度的测定及完整性的检测**方法同第一部分1.2.3.2。

**1.2.3.3逆转录反应合成cDNA**

方法同第一部分1.2.3.3。

**1.2.3.4 PCR**

PCR反应体系见下表，引物序列、产物长度及PCR反应条件见表2.1。将表内组分混匀后加入PCR 管内，瞬时离心，94°C, 2 min→(94°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min)

×38个循环→72°C, 7 min→4°C, 保存。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳，SYBR Green 1染色，于凝胶成像系统中观察。

|  |  |
| --- | --- |
| 成份 | 体积 (µl) |
| 2×PCR Taq Mix | 10 |
| 上游引物 (10 µM) | 1 |
| 下游引物 (10 µM) | 1 |
| cDNA 模板 | 1 |
| ddH2O | 7 |
| 总体积 | 20 |

Table 2.1 Oligonucleotides used to amplify transcripts of VGSCαsubunits.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Gene name | Gene product | Forward primer 5'→3' | Reverse primer 5'→3' | Predicted size (bp) |
| SCN1A | Nav1.1 | TTCATGGCTTCCAATCCTTC | TAGCCCCACCTTTGATTTTG | 178 |
| SCN2A | Nav1.2 | GCCAGCTTATCAATCCCAAA | TCTTCTGCAATGCGTTGTTC | 192 |
| SCN3A | Nav1.3 | CAAAGGGAAGATCTGGTGGA | AAAGGCCAATGCACCACTAC | 115 |
| SCN4A | Nav1.4 | TCAACAACCCCTACCTGACC | ACGGACGAGTTCCCATCATA | 148 |
| SCN5A | Nav1.5 | CACGCGTTCACTTTCCTTC | CATCAGCCAGCTTCTTCACA | 208 |
| SCN8A | Nav1.6 | CGCCTTATGACCCAGGACTA | GTGCCTCTTCCTGTTGCTTC | 247 |
| SCN9A | Nav1.7 | GGCTCCTTGTTTTCTGCAAG | TGGCTTGGCTGATGTTACTG | 196 |
| SCN10A | Nav1.8 | ACCTGGTGGTGCTTAACCTG | TGCTGAAGAAGCTGCAAAGA | 168 |
| SCN11A | Nav1.9 | CTGTGGTCCTGGTCATTGTG | TGCATTCGCTTCTTGCATAC | 233 |

##### **1.2.3.5** **Q-PCR**

引物序列见表2.1，将下表内组分混匀后加入96孔PCR板内，瞬时离心，95°C，30 s→95°C，5 s；60°C，1 min (40个循环)。每一样品均设3个复孔，计算其均值作为CT值。每次PCR反应后均进行熔解曲线分析以确认扩增产物的特异性。目的基因表达量以△Ct表示，△Ct =目的基因CT值－参考基因CT值。

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 成份 | 体积 (µl) |
| SYBR Premix DimerEraser (2 ×) | 10 |
| 上游引物 (10 µM) | 0.6 |
| 下游引物 (10 µM) | 0.6 |
| cDNA 模板 | 1 |
| ddH2O | 7.8 |
| 总体积 | 20 |

#### **1.2.4** **Western Blot**

**1.2.4.1细胞总蛋白的提取**

1）. 融解RIPA细胞裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入PMSF，使PMSF的最终浓度为1 mM。

2）. 离心收集细胞，用PBS漂洗1次，用手指把细胞用力弹散。按照每1-2×106个细胞加入100µl细胞裂解液的比例加入裂解液。再用手指轻弹以充分裂解细胞，4°C或冰上放置60 min, 充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。

3). 充分裂解后，10000-14000g/min 4°C 离心10 min，取上清，即可进行后续的Western

操作，或将上清保存于-80°C。

注意：以上所有步骤均需冰上或4°C 操作。

1.2.4.2 **BCA法蛋白定量**方法同第一部分1.2.4.2。

**1.2.4.3 SDS-PAGE电泳**

1）. 采用购买的4-12%的梯度胶。

2）. 上样。根据测量的蛋白浓度，计算出上样量，上样总量约100µg。样品中加入5×SDS

上样缓冲液至终浓度为1×，95°C 5 min使蛋白充分变性。用微量加样器贴壁吸取样品，将样品吸出不要吸进气泡。将加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品。

6）. 电泳。起始电压为80 V，当溴酚蓝前沿进入分离胶时，将电压升至120 V，继续电泳直到溴酚蓝到达分离胶底部时终止电泳。

**1.2.4.4转膜（半干转）**

方法同第一部分1.2.4.4。

**1.2.4.5免疫反应**

方法同第一部分1.2.4.5。

**1.2.4.6化学发光及显影、定影**

在暗室中，将1×显影液和定影液分别倒入塑料盘中。在红灯下取出X－光片，用剪刀剪裁适当大小（比膜的长和宽均需大1 cm）。将膜取出，放于保鲜膜上平铺，将化学发光液A和B两种试剂等体积混合。然后将发光液滴加到膜蛋白面上，每条膜约

0.5 ml，盖上保鲜膜，孵育2 min, 放入X－光片夹中曝光10 min，取出胶片显影、定影，用自来水冲洗残留的定影液后晾干。

**1.2.4.7凝胶图象分析**

将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

#### **1.2.5** 免疫荧光

方法同第一部分1.2.5。

#### **1.2.6** 电生理记录

MOLT-4细胞铺在左旋多聚赖氨酸包被的盖玻片上，培养2 d后进行实验。细胞置于倒置显微镜(Olympus IX-70)上的灌流槽中，用标准台氏液灌流冲洗细胞。记录钠电流细胞外液（灌流液）为(mmol/L): 5 HEPES, 130 NaCl, 10 CsCl, 1.8 CaCl2, 1 MgCl2, 10 glucose, 0.5 CdCl2,, 用NaOH调整pH值为7.4。记录电极利用P-97拉制仪采用两步法进行拉制并抛光。冲灌电极内液后电阻为3-5 MΩ，电极内液成份为(mmol/L): 10 HEPES, 20 CsCl, 100 CsOH, 100 L-aspartate, 2 MgCl2, 10 TEA-Cl, 10 EGTA, 1.2 Na2ATP,

0.5 Na3GTP, 1.2 Creatine phosphase, 用CsOH调整pH值为7.2。在记录钠电流时，采用传统的全细胞膜片钳记录技术，所用设备为Axopatch 200B放大器和Digidata 1320A数模/模数转化器(Axon Instruments, CA, USA). 采样频率为50 KHz, 滤波频率为10

KHz。电极入液后对液接电位进行补偿，封接成功后补偿电极电容，破膜后补偿膜电容，对串联电阻进行补偿（约80%）。破膜后液接电位没有补偿。细胞钳制电位为- 100 mV，测试电位为-60 mV到+40 mV，每个台阶增加10 mV。记录静息膜电位时采用电流钳

模式，细胞外液成份为(mmol/L): 140.0 NaCl, 5.4 KCl, 1.0 MgCl2, 1.8 CaCl2, 2.3 NaOH,

10.0 HEPES, 10.0 glucose, 用NaOH 调整pH 值为7.4； 细胞内液成份为(mmol/L): 10.0

NaCl, 40.0 KCl, 90 K-aspartate, 1.0 MgCl2, 3.0 Na2ATP, 10.0 EGTA, 10.0 HEPES, 用KOH

调整pH值为7.2。实验后用Clampfit 9.0, Sigmaplot 10.0和Origin 7.0软件分析。实验在室温下进行。

#### **1.2.7** 细胞增殖实验

方法同第一部分1.2.7。

#### **1.2.8** **Transwell** 实验

实验采用8µm孔径的小室，每组实验均独立重复3次。

**1.2.8.1细胞迁移实验**

1）制备细胞悬液

收集MOLT-4 和Jurkat细胞，1000 rpm/min 离心3 min，弃去培养液，PBS 洗涤

2遍，用含BSA的无血清培养基重悬细胞。调整细胞密度至5×105 /ml。

2）接种细胞

A. 24孔板下室加入600µl含FBS的培养基。

B. 把Transwell 小室放入24孔板，取200µl细胞悬液加入Transwell 小室。

C. 细胞常规培养7 h。

3）结果统计

收集下室的细胞用流式细胞仪进行记数或随机在下室取9个视野于倒置显微镜下观察拍照并计数。

**1.2.8.2细胞侵袭实验**

1)制备含基底膜的Transwell小室

A. 包被基底膜：取50 mg/L matrigel 1:8稀释液，用于包被Transwell小室底部膜的上室面，4°C 风干。

B. 水化基底膜：吸出培养板中残余液体，每孔加入50µl含10 g/L BSA的无血清培养液，37°C，30min。

2）制备细胞悬液

收集MOLT-4 和Jurkat细胞，1000 rpm/min离心3 min，弃去培养液，PBS 洗涤

2遍，用含BSA的无血清培养基重悬细胞。调整细胞密度至5×105 /ml。

3）接种细胞

A. 24孔板下室加入600µl含FBS的培养基。

B. 把Transwell 小室放入24孔板，取200µl细胞悬液加入Transwell 小室。

C. 细胞常规培养7 h。

4）结果统计

收集下室的细胞用流式细胞仪进行记数或随机在下室取9个视野于倒置显微镜下观察拍照并计数。

#### **1.2.9** 统计分析

所有数据表示为means±SEM. 采用Student's t-test进行统计学分析。P <0.05有统计学意义。

## **2** 结果

### **2.1** 急性淋巴细胞性白血病细胞和人外周血单个核细胞电压门控钠通道的分子特征

我们首先利用RT-PCR和实时定量PCR技术研究了急性淋巴细胞性白血病细胞和人外周血单个核细胞电压门控钠通道的基因表达亚型。结果表明三株急性淋巴细胞性白血病细胞和人外周血单个核细胞都有电压门控钠通道多个亚型的表达，且以TTX-敏感性- Nav1.3, Nav1.6和Nav1.7为主要表达亚型（图2.1, 表2.2）。急性淋巴细胞性白血病细胞与外周血单个核细胞之间在电压门控钠通道表达亚型和水平上没有明显区别（表2.2）。另外，我们也从蛋白水平研究了电压门控钠通道在Jurkat和MOLT-4细胞的表达。蛋白免疫印迹技术利用Nav 通道特异性抗体检测到一条分子量约250 kDa 的蛋白条带（图

2.2 A）。另外，我们利用免疫荧光技术观察到电压门控钠通道蛋白位于细胞膜上（图2.2B）。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Cell types | Nav1.1 | Nav1.2 | Nav1.3 | Nav1.4 | Nav1.5 | Nav1.6 | Nav1.7 | Nav1.8 | Nav1.9 |
| MOLT-4  Jurkat | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | 13.49±0.12 | 13.88 ±0.15 | 13.02 ±0.16 | 10.71 ±0.13 | NA, CT﹥40 | 16.89 ±0.18 |
| NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | 8.15 ±0.17 | NA, CT﹥40 | 13.7 ±0.20 | 9.63 ±0.23 | 13.26 ±0.19 | NA, CT﹥40 | 14.71 ±0.12 |
| Ball | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | 18.99 ±0.24 | 16.74 ±0.15 | 20.4 ±0.23 | NA, CT﹥40 | 18.11 ±0.19 |
| PBMCs | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | NA, CT﹥40 | 13.50 ±0.26 | 10.54 ±0.11 | 8.78 ±0.21 | NA, CT﹥40 | 16.12 ±0.23 |

Table 2.2 Q-RT-PCR detected VGSCαsubunits expression on MOLT-4, Jurkat, Ball cell lines and PBMCs (△Ct).



Figure 2.1 Expression of VGSCαsubunit identified by RT-PCR amplification in MOLT-4, Jurkat and Ball cell lines. M, DNA marker.



Figure 2.2 Expression of VGSCαsubunit in Jurkat and MOLT-4 T cell lines. (A) Western blot experiments showing the expression of Navα-subunits in cell lines. (B) Cellular localization of pan-Nav channels in Jurkat and MOLT-4 T cells using Immunofluorescence.

### **2.2** 电压门控钠通道的电生理学特征

MOLT-4细胞的静息膜电位约-30.5±1.8 mV (n = 12)，膜电容约14.5±0.7 pF (n =

15）. 在约20%的细胞中，当膜去极化时可以诱发出一种快速激活和快速失活的内向电流（图2.3A）。当把外液的钠离子移除后（无钠外液），该内向电流完全消失（图2.3C）。另外，应用电压门控钠通道特异性阻断剂TTX (2µM)可以完全抑制该电流（图2.3D），这种药理学特征符合TTX-敏感性钠通道的特征。图2.3B展示了MOLT-4细胞钠电流的I-V曲线，该电流激活电压阈值约为-30 mV，峰值电压约为0 mV。以上数据表明MOLT-4 细胞的钠电流主要是TTX-敏感性钠电流。



Figure 2.3 Electrophysiological recordings from MOLT-4 T cells. (A) Traces showing typical recording of the Na+ current triggered from a holding potential of -100 mV to 30 ms-long depolarizing steps at -60 to +40 mV (10 mV increments) with an interpulse interval of 2 s. (B) A

Plot of the current-voltage relationship for the Na+ current recorded as detailed in (A). (C) and (D) Ionic characterization of the fast inward current recorded in the MOLT-4 T cell line. (C) In presence of PSS, containing 130 mM Na+, the current triggered by a depolarizing step of 0 mV from a holding potential of -100 mV was recorded, while when external Na+ was replaced by equimolar choline chloride, it disappeared. (D) The effect of 2µM TTX on the inward current.

### **2.3** 电压门控钠通道在淋巴细胞增殖、迁移和侵袭中的作用

为了研究电压门控钠通道在淋巴细胞中的作用，我们进行了细胞增殖、细胞迁移和细胞侵袭实验。研究结果表明MOLT-4 和Jurkat 细胞的增殖和迁移对TTX 不敏感（图

#### 2.4 A，2.4B)。然而，TTX 可以显著抑制MOLT-4 和Jurkat 细胞的侵袭能力，2µM TTX

抑制率约90% (P <0.001; n =3;图2.4C)。



Figure 2.4 Effect of VGSCs in the proliferation, migration and invasion of human T cell leukemia lines. (A) Relative effect of the TTX on cell proliferation at different concentrations after 48 h incubation. (B) and (C) Effect of 2µM TTX on cell migration and invasion as compared to control without TTX. Data are presented normalized to control values of 100% and are the mean±SEM of three independent experimental repeats. \*\*\**P* <0.001 versus control.

## **3** 讨论

本研究结果表明：（i） 急性淋巴细胞性白血病细胞和正常人外周血单个核细胞主要表达TTX-敏感性钠通道；(ii)电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的转运中发挥着重要的作用。PCR分析结果显示在mRNA水平电压门控钠通道α亚单位有多个基因亚型表达，主要表达亚型为Nav1.3、Nav1.6和Nav1.7；而TTX-抵抗性钠通道- Nav1.5在急性淋巴细胞性白血病细胞和正常人外周血单个核细胞中表达水平较低。这些结果与Fraser等报道不一致[69]，这可能要归因于两个研究小组采用了不同的实验方法，另外，实验所采用的细胞株也需要鉴定。

运用膜片钳技术研究发现MOLT-4细胞的电压门控钠电流激活电压阈值为-30 mV，峰值电压为0 mV，与Annunziato和Diaz的研究结果一致[71, 72]。在MOLT-4细胞所记录到的电压门控钠电流电生理学特征与Nav1.7相符合[71]。另外，2µM TTX能够完全阻断该内向电流。以上数据表明在MOLT-4细胞记录到的内向电流是TTX-敏感性钠电流(Nav1.7)。电流钳模式下记录到MOLT-4细胞的静息膜电位为-30.5±1.8 mV，正好处于电压门控钠通道“窗电流”的电压范围[71]，从而可以满足细胞迁移所需的钠信号。另外，有趣的是，我们发现仅有20%的MOLT-4细胞能够记录到钠电流，说明在淋巴细胞激活过程中电压门控钠通道的表达受到精确的调控。

细胞侵袭实验结果显示TTX可以显著抑制Jurkat和MOLT-4细胞的侵袭能力。由于TTX是电压门控钠通道的特异性阻断剂，说明电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的转运过程中扮演着重要的角色。然而，电压门控钠通道调控细胞侵袭的机制尚不清楚。由于TTX抑制细胞的侵袭而对细胞的迁移没有影响，可以据此推断电压门控钠通道可能调控一些目前还不清楚的蛋白酶的分泌，这些蛋白酶对于消化细胞外基质是必须的。例如，通过电压门控钠通道进入胞内的钠离子可以通过Na+-H+交换等机制降低（酸化）胞内的pH值，从而增强分泌到细胞外基质的半胱氨酸组织蛋白酶的活性，最终引起乳腺癌MDA-MB-231细胞发生侵袭[76]。另外，电压门控钠通道β亚单位参与细胞支架链接，并作为一个细胞粘附分子与胞外基质相互作用共同介导细胞的迁移和聚集[77, 78]。

总之，本研究结果表明急性淋巴细胞性白血病细胞表达功能性电压门控钠通道-TTX-敏感性钠通道，电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的侵袭中扮演着重要的角色。由于正常人外周血单个核细胞也表达电压门控钠通道，可以据此推断电压门控钠通道在人正常T淋巴细胞的转运及参与炎症反应中同样发挥着重要的作用。

结**论**

### 1. 急性淋巴细胞性白血病细胞表达T-型钙通道，而正常人外周血单个核细胞不表达T-

型钙通道；

2. T-型钙通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的增殖和凋亡中发挥着重要的作用；

3. T-型钙通道阻断剂抑制急性淋巴细胞性白血病细胞增殖和诱导细胞凋亡；

4. 米贝拉地尔和NNC-55-0396 破坏细胞内钙稳态，并诱导内质网钙释放；

5. T-型钙通道阻断剂下调MOLT-4细胞的ERK信号通路；

6. 急性淋巴细胞性白血病细胞和正常人外周血单个核细胞表达电压门控钠通道；

7. 电压门控钠通道在急性淋巴细胞性白血病细胞的侵袭中发挥着重要的作用。

参考文献

[[1] Graham D. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Graham%20DK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Salzberg D. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Salzberg%20DB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Kurtzberg J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kurtzberg%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Sather S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sather%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Matsushima G. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Matsushima%20GK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., Keating A. K., Liang X., [Lovell M. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lovell%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Williams S. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Williams%20SA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Dawson T. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dawson%20TL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Schell M. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Schell%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., Anwar A. A., [Snodgrass H. R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Snodgrass%20HR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)., [Earp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Earp%20HS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16675557)H. S. Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(9): 2662-2669.

[2] Pui C. H., Relling M. V., Downing J. R. Acute lymphoblastic leukemia [J]. N Engl J Med, 2004, 350(15): 1535-1548.

[3] Clapham D. E. Calcium signaling [J]. Cell, 2007, 131(6): 1047-1058.

[4] Monteith G. R., Davis F. M., Roberts-Thomson S. J. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences [J]. J Biol Chem, 2012, 287(38): 31666-31673.

[5] Ciapa B., Pesando D., Wilding M., Whitaker M. Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels [J]. Nature, 1994, 368(6474): 875-878.

[6] Choi D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity [J]. J Neurosci, 1987, 7(2): 369-379.

[7] Boynton A. L., Whitfield J. F., Isaacs R. J., Tremblay R. G. Different extracellular calcium requirements for proliferation of nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic mouse cells [J]. Cancer Res, 1977, 37(8Pt1): 2657-2661.

[8] Toyota M., Ho C., Ohe-Toyota M., Baylin S. B., Issa J. P. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5'CpG island in human tumors [J]. Cancer Res, 1999, 59(18): 4535-4541.

[9] Heo J. H., Seo H. N., ChoeY. J., Kim S., Oh C. R., KimY. D., Rhim H., Choo D. J., Kim J., LeeJ. Y. T-type Ca2+ channel blockers suppress the growth of human cancer cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(14): 3899-3901.

[10] Li W., Zhang S. L., Wang N., Zhang B. B., Li M. Blockade of T-type Ca(2+) channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation [J]. Cancer Invest, 2011, 29(5): 339-346.

[11] Valerie N. C., Dziegielewska B., Hosing A. S., Augustin E., Gray L. S., Brautigan D. L., Larner J. M., Dziegielewski J. Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(7): 888-897.

[12] Zhang Y., Zhang J., Jiang D., Zhang D., Qian Z., Liu C., Tao J. Inhibition of T-type Ca(2+) channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration [J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(4): 1247-1260.

[13] Taylor J. T., Huang L., Pottle J. E., Liu K., Yang Y., Zeng X., Keyser B. M., Agrawal K. C., Hansen J. B., Li M. Selective blockade of T-type Ca2+ channels suppresses human breast cancer cell proliferation [J]. Cancer Lett, 2008, 267(1): 116-124.

[14] Lu F., Chen H., Zhou C., Liu S., Guo M., Chen P., Zhuang H., Xie D., Wu S. T-type Ca2+ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation [J]. Cell Calcium, 2008, 43(1): 49-58.

[15] Li Y., Liu S., Lu F., Zhang T., Chen H., Wu S., Zhuang H. A role of functional T-type Ca2+ channel in hepatocellular carcinoma cell proliferation [J]. Oncol Rep, 2009, 22(5): 1229-1235.

[16] Das A., Pushparaj C., BahíN., Sorolla A., Herreros J., Pamplona R., Vilella R., Matias-Guiu X., MartíR. M., CantíC. Functional expression of voltage -gated calcium channels in human melanoma [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2012, 25(2): 200-212.

[17] Dziegielewska B., Brautigan D. L., Larner J. M., Dziegielewski J. T-type Ca2+ channel inhibition induces p53 dependent cell growth arrest and apoptosis through activation of p38-MAPK in colon cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(3): 348-358.

[18] Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels [J]. Physiol Rev, 2003, 83(1): 117-161.

[19] Crunelli V., Toth T. I., Cope D. W., Blethyn K., Hughes S. W. The 'window' T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states [J]. J Physiol, 2005, 562(Pt1): 121-129.

[20] Carbone E. & H. D. Lux. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons [J]. Biophys J, 1984, 46(3): 413-418.

[21] McCobb D. P., Best P. M., Beam K. G. Development alters the expression of calcium currents in chick limb motorneurons [J]. Neuron, 1989, 2(6): 1633-1643.

[22] Kostyuk P., Pronchuk N., Savcehnko A., Verkhratsky A. Calcium currents in aged rat dorsal root ganglion neurons [J]. J Physiol, 1993, 461: 467-483.

[23] Xu X. P. & P. M. Best. Increase in T-type calcium current in atrial myocytes from adult rats with growth hormone-secreting tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(12): 4655-4659.

[[24] Mishra S. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mishra%20SK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8013072). & K. [Hermsmeyer](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hermsmeyer%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8013072). Selective inhibition of T-type Ca2+ channels by Ro 40-5967 [J]. [Circ Res](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mishra%2BSK%2C%2BHermsmeyer%2BK.%2BCirc%2BRes), 1994, 75(1): 144-148.

[[25] Huang L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huang%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [Keyser B. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Keyser%20BM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [Tagmose T. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tagmose%20TM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [Hansen J. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hansen%20JB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [Taylor J. T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Taylor%20JT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [Zhuang H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhuang%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [Zhang M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [RagsdaleD. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ragsdale%20DS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587)., [LiM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14718587). NNC55-0396

[(1S,2S) -2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl) propyl] -N-methylamino) ethyl) -6-fluoro-1,2,3,4-tetrahy dro-1-isopropyl-2-naphtyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels [J]. [J Pharmacol Exp Ther](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Huang%2C%2BL.%2Bet%2Bal.%2B(2004)%2BJ.%2BPharmacol.%2BExp.%2BTher.%2B309%2C193), 2004, 309(1): 193-199.

[26] Choi J., Park J. H., Kwon O. Y., Kim S., Chung J. H., Lim D. S., Kim K. S., Rhim H., Han Y. S. T-type calcium channel trigger p21ras signaling pathway to ERK in Cav3.1-expressed HEK293 cells [J]. Brain Res, 2005, 1054(1): 22-29.

[27] Kotturi M. F., Carlow D. A., Lee J. C., Ziltener H. J., Jefferies W. A. Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes [J]. J Biol Chem, 2003, 278(47): 46949-46960.

[28] Atherfold P. A., Norris M. S., Robinson P. J., Gelfand E. W., Franklin R. A. Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes [J]. Mol Immunol, 1999, 36(8): 543-549.

[29] Franklin R. A., Atherfold P. A., McCubrey J. A. Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes occurs via p56(Lck) and CaM-kinase [J]. Mol Immunol, 2000, 37(11): 675-683.

[30] Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(7): 552-565.

[31] Orrenius S. & P. Nicotera. The calcium ion and cell death [J]. J Neural Transm Suppl, 1994, 43:1-11.

[32] Berridge M. J., Bootman M. D., Lipp P. Calcium--a life and death signal [J]. Nature, 1998, 395(6703): 645-648.

[33] Rossier M. F. T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria [J]. Cell Calcium, 2006, 40(2):155-164.

[34] Csordás G., Renken C., Várnai P., Walter L., Weaver D., Buttle K. F., Balla T., Mannella C. A., Hajnóczky G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria [J]. J Cell Biol, 2006, 174(7): 915-921.

[35] Scorrano L., Oakes S. A., Opferman J. T., Cheng E. H., Sorcinelli M. D., Pozzan T., Korsmeyer

S. J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis [J]. Science, 2003, 300(5616):135-139.

[36] Whitfield J. F. Calcium signals and cancer [J]. Crit Rev Oncog, 1992, 3 (1-2): 55-90.

[37] Taylor J. T., Zeng X. B., Pottle J. E., Lee K., Wang A. R., Yi S. G., Scruggs J. A., Sikka S. S., Li M. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling [J]. World J Gastroenterol, 2008(), 14(32): 4984-4991.

[[38] Latour I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Latour%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Louw D. F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Louw%20DF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Beedle A. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Beedle%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Hamid J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hamid%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Sutherland G. R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sutherland%20GR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Zamponi G. W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zamponi%20GW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657). Expression of T-type calcium channel splice variants in human glioma [J]. [Glia](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378657), 2004, 48(2): 112-119.

[39] O'Brien P. J. & N. Ali. Lymphocyte calcium extrusion: kinetic and thermodynamic measurements using ratiometric dual-emission spectrofluorometry [J]. Mol Cell Biochem, 1990, 96(1): 89-96.

[40] Donnadieu E., Bismuth G., Trautmann A. Calcium fluxes in T lymphocytes [J]. J Biol Chem, 1992, 267(36): 25864-25872.

[41] Haverstick D. M., Dicus M., Resnick M. S., Sando J. J., Gray L. S. A role for protein kinase Cbetal in the regulation of Ca2+ entry in Jurkat T cells [J]. J Biol Chem, 1997, 272(24):

15426-15433.

[42] Panner A. & R. D. Wurster. T-type calcium channels and tumor proliferation [J]. Cell Calcium, 2006, 40(2): 253-259.

[43] Ohkubo T. & J. Yamazaki. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells [J]. Int J Oncol, 2012, 41(1): 267-275.

[44] Kahl C. R. & A. R. Means. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways [J]. Endocr Rev, 2003, 24(6): 719-736.

[45] Panner A., Cribbs L. L., Zainelli G. M., Origitano T. C., Singh S., Wurster R. D. Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells [J]. Cell Calcium, 2005, 37(2): 105-119.

[46] Steinhardt R. A. & J. Alderton. Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo [J]. Nature, 1988, 332(6162): 364-366.

[47] Hsu Y. F., Lee T. S., Lin S. Y., Hsu S. P., Juan S. H., Hsu Y. H., Zhong W. B., LeeW. S. Involvement of Ras/Raf-1/ERK actions in the magnolol-induced upregulation of p21 and cell-cycle arrest in colon cancer cells [J]. Mol Carcinog, 2007, 46(4): 275-283.

[48] Tsukamoto I. & S. Kojo. Effect of calcium channel blockers and trifluoperazine on rat liver regeneration [J]. Eur J Pharmacol, 1987, 144(2): 159-162.

[49] Fan H., Villegas C., Wright J. A. Ribonucleotide reductase R2 component is a novel malignancy determinant that cooperates with activated oncogenes to determine transformation and malignant potential [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 14036-14040.

[[50] Son Y. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Son%20YK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Hong da H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hong%20da%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Li H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Kim D. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kim%20DJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Na S. H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Na%20SH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Park H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Park%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Jung W. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jung%20WK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838)., [Choi I. W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Choi%20IW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838), [Park W. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Park%20WS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24989838). The Ca2+ channel inhibitor NNC 55-0396 inhibits voltage-dependent K+ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells [J]. [J Pharmacol Sci](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=the%20ca2%2B%20channel%20inhibitor%20nnc%2055-0396%20inhibits%20voltage-dependent%20k%2B%20channels%20in%20rabbit%20coronary%20arterial%20smooth%20muscle%20cells&amp;cmd=correctspelling), 2014, 125(3): 312-319.

[51] Rizzuto R., Pinton P., Ferrari D., Chami M., Szabadkai G., Magalhaes P. J., Di Virgilio F., Pozzan T. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8619-8627.

[52] Eberhard M., Miyagawa K., Hermsmeyer K., Erne P. Effects of mibefradil on intracellular Ca2+ release in cultured rat cardiac fibroblasts and human platelets [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995, 353(1):94-101.

[53] Das A., Pushparaj C., Herreros J., Nager M., Vilella R., Portero M., Pamplona R., Matias-Guiu X., MartíR. M., CantíC. T -type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2013, 26(6): 874-885.

[54] Halestrap A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die [J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt2): 232-237.

[55] Chandy K. G., Williams C. B., Spencer R. H., Aguilar B. A., Ghanshani S., Tempel B. L., Gutman G. A. A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions [J]. Science, 1990, 247 (4945): 973-975.

[56] Grissmer S., Dethlefs B., Wasmuth J. J., Goldin A. L., Gutman G. A., Cahalan M. D., Chandy

K. G. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K+ channel gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (23): 9411-9415.

[57] Cai Y. C., Osborne P. B., North R. A., Dooley D. C., Douglass J. Characterization and functional expression of genomic DNA encoding the human lymphocyte type n potassium channel [J]. DNA Cell Biol, 1992, 11 (2): 163-172.

[[58] Desai](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Desai%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10991935) R., [Peretz](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Peretz%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10991935) A., [Idelson](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Idelson%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10991935) H., [Lazarovici](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lazarovici%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10991935) P., [Attali B.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Attali%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10991935) Ca2+-activated K+ channels in human leukemic Jurkat T cells. Molecular cloning, biochemical and functional characterization [J]. [J Biol Chem](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10991935), 2000, 275 (51): 39954-39963.

[59] Grissmer S., Nguyen A. N., Cahalan M. D. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology [J]. J Gen Physiol, 1993, 102(4): 601-630.

[60] Lewis R. S. & M. D. Cahalan. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca2+ and transmembrane Ca2+ current in human leukemic T cells [J]. Cell Regul, 1989, 1(1): 99 -112.

[61] Hoth M. & R. Penner. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells [J]. J Physiol, 1993, 465: 359-386.

[62] Lewis R. S., Ross P. E., Cahalan M. D. Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes [J]. J Gen Physiol, 1993, 101(6): 801-826.

[[63] Cahalan](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cahalan%20MD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11506193) M. D., [Wulff](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wulff%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11506193) H., [Chandy K. G.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chandy%20KG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11506193) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system [J]. [J Clin Immunol](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506193), 2001, 21(4): 235-252.

[[64] Butcher](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Butcher%20EC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8600538) E. C. & L. J. [Picker](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Picker%20LJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=8600538). Lymphocyte homing and homeostasis [J]. [Science](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Butcher%2C%2BE.C.%2Band%2BPicker%2C%2BL.J.%2B(1996)%2BScience%2B272%2C%2B60%E2%80%9366), 1996, 272(5258): 60-66.

[[65] Parsey](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Parsey%20MV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7688389) M. V. & G. K. [Lewis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lewis%20GK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=7688389) Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells [J]. [J Immunol](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=2%5D%2BParsey%2C%2BM.V.%2Band%2BLewis%2C%2BG.K.%2B(1993)%2BJ.%2BImmunol.%2B151%2C%2B1881%E2%80%93%2B1893), 1993, 151(4): 1881-1893.

[66] Fraser S. P., Diss J. K., Chioni A. M., Mycielska M. E., Pan H., Yamaci R. F., [Pani F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pani%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Siwy Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Siwy%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Krasowska M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Krasowska%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Grzywna Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Grzywna%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Brackenbury W. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brackenbury%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Theodorou D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Theodorou%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Koyutürk M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Koyut%C3%BCrk%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Kaya H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kaya%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Battaloglu E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Battaloglu%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [De Bella M. T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=De%20Bella%20MT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Slade M. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Slade%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Tolhurst R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tolhurst%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Palmieri C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Palmieri%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Jiang J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jiang%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Latchman D. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Latchman%20DS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Coombes R. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Coombes%20RC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(15): 5381-5389.

[67] Brackenbury W. J., Chioni A. M., Diss J. K., Djamgoz M. B. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 101(2): 149-160.

[68] Laniado M. E., Lalani E. N., Fraser S. P., Grimes J. A., Bhangal G., Djamgoz M. B., [Abel](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abel%20PD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978) P. D. Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro [J]. Am J Pathol, 1997, 150(4): 1213-1221.

[69] Fraser S. P., Diss J. K., Lloyd L. J., Pani F., Chioni A. M., George A. J., [Djamgoz](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632) M. B. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na+ channel activity [J]. FEBS Lett, 2004, 569(1-3): 191-194.

[70] Roger S., Rollin J., Barascu A., Besson P., Raynal P. I., Iochmann S., [Lei](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lei%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016) M., [Bougnoux](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bougnoux%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016) P., [Gruel](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gruel%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016) Y., [Le Guennec](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Le%20Guennec%20JY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016) J. Y. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(4): 774-786.

[71] Fulgenzi G., Graciotti L., Faronato M., Soldovieri M. V., Miceli F., Amoroso S., [Annunziato](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Annunziato%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569) L., [Procopio](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Procopio%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569) A., [Taglialatela](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Taglialatela%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569) M. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7): 1146-1159.

[72] Diaz D., Delgadillo D. M., Hernandez-Gallegos E., Ramirez-Dominguez M. E., Hinojosa L. M., Ortiz C. S., [Berumen](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Berumen%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17051596) J., [Camacho](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Camacho%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17051596) J., [Gomora](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gomora%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17051596) J. C. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer [J]. J Cell Physiol 2007, 210(2): 469-478.

[73] Coussens L. M. & Z. Werb. Inflammation and cancer [J]. Nature, 2002, 420 (6917): 860-867.

[74] Pollard J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4 (1): 71-78.

[[75] Catterall](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Catterall%20WA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10798388) W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels [J]. [Neuron](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798388), 2000, 26(1): 13-25.

[76] Gillet L., Roger S., Besson P., Lecaille F., Gore J., Bougnoux P., Lalmanach G., Le Guennec

J. Y. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells [J]. J Biol Chem, 2009, 284(13): 8680-8691.

[[77] Malhotra](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Malhotra%20JD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10753953) J. D., [Kazen-Gillespie](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kazen-Gillespie%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10753953) K., [Hortsch](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hortsch%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10753953) M., [Isom](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Isom%20LL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10753953) L. L. Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact [J]. [J Biol Chem](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753953) 2000, 275(15): 11383-11388.

[78] I[som](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Isom%20LL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11779698) L. L. The role of sodium channels in cell adhesion [J]. [Front Biosci](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779698), 2002, 7: 12-23.

##### 综述

**一T-型钙通道与肿瘤**

**摘要：**T-型钙通道是表达于细胞质膜上的一种重要离子通道蛋白，具有低电压激活、低电导、快速失活等特性，在多种肿瘤组织细胞表达异常上调。T-型钙通道与肿瘤的增殖和凋亡具有密切的关系，其表达具有细胞周期依赖性。应用T-型钙通道阻断剂及小分子siRNA干扰α1亚单位表达可以显著抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡。T-型钙通道有望成为治疗肿瘤的新靶点。

关键词：T-型钙通道； 肿瘤； 增殖； 凋亡

细胞内钙离子作为一个重要的信号转导信使普遍存在于细胞的生理活动中，包括增殖、分化、凋亡和细胞坏死等。在细胞增殖和生长周期中精确地调控细胞内钙离子浓度是至关重要的[1]，细胞内钙过量或缺失都会导致细胞死亡。细胞受到刺激时，细胞内游离钙离子浓度可以通过胞外钙内流以及胞内钙库的释放两种方式瞬间提高100倍以上，达到微摩尔级别，从而满足各种生理功能的需要。其中胞外钙离子内流主要通过质膜上电压门控钙通道、配体门控钙通道和钙池操纵性钙通道，而胞内的钙释放主要通过RynR 和

IP3R两种途径[2]。在非兴奋性组织上，包括上皮组织，没有电压门控钙通道的表达。在淋巴细胞质膜上，研究表明有钙通道的表达，主要包括钙池操纵性钙通道、L-型钙通道及TRP家族[3, 4, 5, 6, 7]，从而满足淋巴细胞的激活和增殖对钙离子的需要，但未发现T-型钙通道的表达。然而，近来研究表明，恶性肿瘤细胞质膜上有T-型钙通道的表达，尽管对其功能的研究刚刚起步。对于正常的组织细胞，胞内游离钙离子在细胞增殖周期中向S期和M期转变及S期和M期的完成非常重要。而在肿瘤细胞增殖周期中，钙信号途径发生了改变[8]，可以通过产生大量的钙结合信号蛋白而不再受制于正常的Ca2+依赖性的限制[9]。由于多种肿瘤细胞表达T-型钙通道，所以可能是该通道在异常改变的肿瘤细胞钙信号传导路径中发挥作用，从而满足肿瘤细胞快速增殖对Ca2+的需要[10]。

**1. T-型钙通道的生理学特征**

钙通道是表达于细胞质膜上一种重要的离子通道蛋白。它由多个亚单位组成：包括

α1、α2、β、γ和δ等亚单位。其中α1是构成钙通道的主要亚单位，它的基本结构和钠通道的α亚单位极为相似，也是由4个结构域组成，而每个结构域中都含有6个跨膜螺旋。细胞膜上的钙通道主要包括电压门控钙通道(VGCCs)、配体门控钙通道、TRP家族及钙池操纵性钙通道(SOCs)四大类[11]。而VGCCs又可以分为低电压激活(low voltage activated, LVA)和高电压激活(high voltage activated, HVA)两类。高电压激活型钙通道包括L、N、P、Q和R型，大约在-40 mV左右激活，失活慢。低电压激活型钙通道即T-型钙通道(transient calcium channels)，具有低电压激活（约-70 mV）、低电导、快速失活等特性，基因分类包括CaV3.1 (α1G)、CaV3.2 (α1H) 和CaV3.3 (α1I)三个亚型

[12, 13]. T-型钙通道的低电压依赖性激活和失活、慢速去激活以及“窗电流”的特性使其在

非刺激或静息膜电位状态下调节细胞内游离钙离子浓度（钙稳态）发挥重要的作用，从而调节细胞的增殖、分化和凋亡、死亡[2, 12]。L-型钙通道广泛表达于可兴奋组织细胞膜上，而T-型钙通道在成熟组织上主要表达于兴奋性起搏细胞、神经元和分泌细胞上，在胚胎时期的各种组织上表达丰富。报道认为：胚胎早期骨骼肌和心肌细胞上都有T-型钙通道大量表达，而出生后表达显著下降，在成年骨骼肌细胞上表达消失，同时成年心肌细胞上，T-型钙通道仅表达于窦房结和房室结上；相反，在某些神经元上，T-型钙通道的表达出生后显著增加[14]。最近的研究认为，成年组织上表达消失的T-型钙通道在某些病理情况下出现表达重现，比如心肌肥大、神经疾病、肿瘤细胞等[14]。

**2. T-型钙通道对细胞周期和增殖的调控**

T-型钙通道在细胞周期的不同时期表达不同表明其在调控细胞周期过程中可能发挥着重要的作用。有报道认为在细胞处于G2/M期时通常有T-型钙通道的表达，而当细胞处于非增殖时相G0/G1 期时，主要表达L-型钙通道[15, 16]。

多位学者研究表明，在非肿瘤细胞存在细胞周期依赖性地T-型钙通道表达改变。譬如，在血管平滑肌细胞中[17]，当细胞处于G1期时，T-型钙电流占总钙通道电流的比例为37%，而当细胞处于S期和M期早期时，该比例可以增加到90%。在人的肺动脉平滑肌细胞，利用siRNA 技术干扰T-型钙通道α1G 亚基的表达可以抑制细胞的增殖，G0/G1期细胞所占的比例增加[18]。同时，蛋白免疫印迹也表明T-型钙通道的蛋白表达在G2/M期明显增高。这些研究表明在细胞周期处于S期DNA合成时相时，T-型钙通道表达增

强，从而为细胞进入G2/M期做好准备。另外，一些成熟的组织在病理状态下会出现T-型钙通道的表达重现，如心肌疾病[19]、心肌肥大[20]、损伤后的新生血管平滑肌细胞[21]。这些研究表明T-型钙通道在某些特定条件下对调控细胞增殖起着非常重要的作用。

**3. T-型钙通道在肿瘤细胞的表达**

研究发现T-型钙通道在多种肿瘤和肿瘤细胞株中表达，如卵巢癌[22]、神经胶质瘤[23]、黑色素瘤[24]、乳腺癌[25]、食道癌[26]、结肠癌[27]、白血病细胞[27]、成神经细胞瘤[28, 29, 30]、前列腺癌[31, 32, 33]，并在部分肿瘤细胞记录到T-型钙电流(ICa, T)，T-型钙通道表达量（尤其功能表达）和肿瘤细胞的生长速度、迁移能力密切相关。而用T-型钙通道阻断剂或siRNA技术干扰T-型钙通道的表达可以显著抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的凋亡[34]。

T-型钙通道可以作为肿瘤治疗的一个潜在靶点。研究认为T-型钙通道阻断剂米贝拉地尔可以抑制星形细胞瘤(U87-MG)和成神经细胞瘤(N1E-115)的增殖；过表达T-型钙通道可以使该肿瘤细胞的生长速度增快，而应用反义核酸干扰T-型钙通道的表达可以抑制细胞的增殖[35]。在人前列腺癌上皮细胞(LNCap)[32]及人食管癌组织和细胞株中[26]也发现有T-型钙通道在电流和mRNA水平表达的增加。同样，在这些肿瘤细胞中经反义寡核苷酸或阻滞剂处理后细胞增殖变慢。这些数据表明T-型钙通道在肿瘤增殖中扮演着重要的角色，而阻断T-型钙通道可以抑制肿瘤细胞的生长。鉴于T-型钙通道在多种肿瘤细胞有表达且在细胞周期进程中发挥着重要的作用，研究人员认为这将为肿瘤的治疗提供一个全新的靶点。

**4. T-型钙通道阻断剂对肿瘤增殖的影响**

由于T-型钙通道在多种类型肿瘤细胞有表达且在肿瘤细胞增殖中发挥着重要的作用，所以开发出新型的T-型钙通道阻断剂将会有助于那些表达T-型钙通道肿瘤的治疗。长期以来，米贝拉地尔被认为是T-型钙通道的选择性阻断剂，尽管它确实会影响其

他离子通道的功能，尤其在微摩尔级别浓度。米贝拉地尔对T-型钙通道的阻断选择性是L-型钙通道的10-20倍[29]。米贝拉地尔可以抑制多种细胞的增殖，如外周血单核细胞[36]、大鼠平滑肌细胞[21]、小鼠肝细胞[37]、内皮细胞[38]、人类肺动脉平滑肌细胞以及NG1-8-15[39]。在对人星形细胞瘤(U87-MG)和小鼠成神经细胞瘤(N1E-115)研究中发现[35]，低于微摩尔浓度的米贝拉地尔可以和α1G反义寡核苷酸同等程度地抑制细胞的增殖。

为了验证米贝拉地尔抑制细胞增殖是否归因于对T-型钙通道阻断的作用，研究人员在人星形细胞瘤(U87-MG)和小鼠成神经细胞瘤(N1E-115)过表达α1H，当利用20 mM KCl使细胞膜去极化时（仅能激活T-型钙通道），胞内游离钙离子浓度增高，而EC50浓度的米贝拉地尔可以完全抑制胞内钙离子的增高。但Nilius等[38]研究内皮细胞发现，米贝拉地尔除可以阻断T-型钙电流外，还可以抑制钙激活氯电流、容积敏感性氯电流和钙池操纵性钙通道。因此在米贝拉地尔对细胞增殖抑制的研究中亦应考虑其所致的细胞容积膨胀对细胞增殖的影响。

报道认为抗精神病药匹莫齐特可以抑制乳腺癌[40]和星形细胞瘤[41]的增殖。像米贝拉地尔一样，研究人员认为匹莫齐特抑制细胞增殖的作用归因于阻断T-型钙通道的作用。然而，米贝拉地尔对T-型钙通道具有更高的选择性。另外，Bertolesli等[29]在视网膜母细胞瘤（同时表达α1G、α1H）比较了米贝拉地尔和匹莫齐特的作用，他们发现这两种药在抑制细胞增殖的同时也会引起细胞死亡，尤其匹莫齐特诱导细胞凋亡的作用更明显。当利用反义寡核苷酸干扰α1G mRNA表达后，米贝拉地尔抑制视网膜母细胞瘤增殖的作用被明显减弱，而匹莫齐特的作用则没有明显改变。他们认为匹莫齐特抑制细胞增殖的作用包括T-型钙通道非依赖性。

**5. T-型钙通道阻断剂对肿瘤细胞凋亡的影响**

研究发现，T-型钙通道阻断剂除了可以抑制肿瘤细胞增殖，还可以促进肿瘤细胞凋亡[34, 42, 43]。Valerie[34]等研究发现T-型钙通道阻断剂可以通过抑制Akt信号通路促进恶性胶质瘤细胞凋亡。Das[43]等研究认为T-型钙通道阻断剂通过引起内质网压力从而促进恶性黑素瘤细胞凋亡。关于T-型钙通道阻断剂对肿瘤细胞凋亡的影响至今报道甚少，而其机制更值得进一步研究。

鉴于T-型钙通道在多种类型肿瘤细胞表达以及其与肿瘤细胞增值的关系，开发出新型特异性T-型钙通道阻断剂将会为那些传统治疗方法疗效不佳的肿瘤治疗提供一条新的途径。但由于许多正常成熟组织也有T-型钙通道的表达，其副作用不可忽视。

参考文献

[1] Ciapa B., Pesando D., Wilding M., Whitaker M. Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels [J]. Nature, 1994, 368(6474): 875-878.

[2] Taylor J. T., Zeng X. B., Pottle J. E., Lee K., Wang A. R., Yi S. G., Scruggs J. A., Sikka S. S., LiM. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(32): 4984-4991.

[[3] Kotturi M. F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kotturi%20MF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12954628)., [Carlow D. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Carlow%20DA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12954628)., [Lee J. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lee%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12954628)., [Ziltener H. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ziltener%20HJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12954628)., [Jefferies W. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jefferies%20WA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12954628). Identification and Functional Characterization of Voltage-dependent Calcium Channels in T Lymphocytes [J]. [J Biol Chem,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Identification%2Band%2BFunctional%2BCharacterization%2Bof%2BVoltage-dependent%2BCalcium%2BChannels%2Bin%2BT%2BLymphocytes) 2003, 278(47): 46949-46960.

[[4] Kerschbaum H. H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kerschbaum%20HH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9933165)., [Cahalan M. D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cahalan%20MD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9933165). Single-Channel Recording of a Store-Operated Ca(2+) Channel in Jurkat T Lymphocytes [J]. [Science,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Single-Channel%2BRecording%2Bof%2Ba%2BStore-Operated%2BCa21%2BChannel%2Bin%2BJurkat%2BT%2BLymphocytes) 1999, 283(5403): 836-839.

[[5] Fomina A. F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fomina%20AF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10995447)., [Fanger C. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fanger%20CM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10995447)., [Kozak J. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kozak%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10995447)., [Cahalan M. D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cahalan%20MD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10995447). Single channel properties and regulated expression of Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) channels in human T cells [J]. [J Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Single%2BChannel%2BProperties%2Band%2BRegulated%2BExpression%2Bof%2BCa%2B2%2B1%2BRelease-Activated%2BCa%2B2%2B1%2B(CRAC)%2BChannels%2Bin%2BHuman%2BT%2BCells) 2000, 150(6): 1435-1444.

[[6] Badou A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Badou%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Basavappa S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Basavappa%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Desai R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Desai%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Peng Y. Q](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Peng%20YQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Matza D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Matza%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Mehal W. Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mehal%20WZ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Kaczmarek L. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kaczmarek%20LK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Boulpaep E. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Boulpaep%20EL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280)., [Flavell R. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Flavell%20RA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15637280). Requirement of Voltage-Gated Calcium Channelß4 Subunit for T Lymphocyte Functions [J]. [Science,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Requirement%2Bof%2BVoltage-Gated%2BCalcium%2BChannel%2B%C3%9F4%2BSubunit%2Bfor%2BT%2BLymphocyte%2BFunctions) 2005, 307(5706): 117-121.

[7] Vig M., Kinet J. P. Calcium signaling in immune cells [J]. Nat Immunol, 2009, 10(1): 21-27.

[8] Whitfield J. F. Calcium signals and cancer [J]. Crit Rev Oncog, 1992, 3(1-2): 55-90.

[9] Kifor O., Diaz R., Butters R., Brown E. M. The Ca2+-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells [J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(5): 715-725.

[[10] Gray LS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gray%20LS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Perez-Reyes E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Perez-Reyes%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Gomora JC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gomora%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Haverstick DM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Haverstick%20DM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Shattock M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shattock%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [McLatchie L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=McLatchie%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Harper J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Harper%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Brooks G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brooks%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Heady T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Heady%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598), [Macdonald TL](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Macdonald%20TL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15488598). The role of voltage gated T-type Ca2+ channel isoforms in mediating" capacitative" Ca2+ entry in cancer cells [J]. [Cell Calcium,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2Brole%2Bof%2Bvoltage%2Bgated%2BT-type%2BCa2%2B%2Bchannel%2Bisoforms%2Bin%2Bmediating%2B%E2%80%9Ccapacitative%E2%80%9D%2BCa2%2B%2Bentry%2Bin%2Bcancer%2Bcells) 2004, 36(6): 489-497.

[11] Prevarskaya N., Skryma R., Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(3): 107-121.

[[12] Perez-Reyes E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Perez-Reyes%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12506128). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels [J]. [Physiol Rev,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506128) 2003, 83(1): 117-161.

[13] Yunker A. M., McEnery M. W. Low-voltage-activated (" T-type") calcium channels in review [J]. J Bioenerg Biomembr, 2003, 35(6): 533-575.

[14] Lory P., Bidaud I., Chemin J. T-type calcium channels in differentiation and proliferation [J]. Cell Calcium, 2006, 40(2): 135-146.

[15] Akaike N., Kanaide H., Kuga T., Nakamura M., Sadoshima J., Tomoike H. Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture [J]. J Physiol, 1989, 416: 141-160.

[16] Richard S., Neveu D., Carnac G., Bodin P., Travo P., Nargeot J. Differential expression of voltage-gated Ca(2+) -currents in cultured aortic myocytes [J]. Biochem Biophys Acta, 1992, 1160(1): 95-104.

[17] Kuga T., Kobayaski S., Hirakawa Y., Kanaide H., Takeshita A. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca2+ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture [J]. Circ Res, 1996, 79(1): 14-19.

[18] Rodman D. M., Reese K., Harral J., Fouty B., Wu S., West J., Hoedt-Miller M., Tada Y., Li K. X., Cool C., Fagan K., Cribbs L. Low voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes [J]. Circ Res, 2005, 96(8): 864-872.

[19] Bkaily G., Sculptoreanu A., Jacques D., Jasmin G. Increases of T-type Ca2+ current in heart cells of the cardiomyopathic hamster [J]. Mol Cell Biochem, 1997, 176(1-2): 199-204.

[20] Nuss H. B., Houser S. R. T-type Ca2+ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes [J]. Circ Res*,* 1993, 73(4): 777-782.

[21] Schmitt R., Clozel J. P., Iberg N., Buhler F. R. Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995; 15(8): 1161-1165.

[[22] Li W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21438841)., [Zhang S. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20SL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21438841)., [Wang N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21438841)., [Zhang B. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhang%20BB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21438841)., [Li M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21438841). Blockade of T-type Ca (2+) channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation [J]. [Cancer Invest,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Blockade%2Bof%2BT-Type%2BCa2%2B%2BChannels%2BInhibits%2BHuman%2BOvarian%2BCancer%2BCell%2BProliferation) 2011, 29(5): 339-346.

[[23] Latour I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Latour%20I%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Louw D. F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Louw%20DF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Beedle A. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Beedle%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Hamid J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hamid%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Sutherland G. R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sutherland%20GR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657)., [Zamponi G. W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zamponi%20GW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15378657). Expression of T-Type Calcium Channel Splice Variants in Human Glioma [J]. [Glia,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378657) 2004, 48(2): 112-119.

[[24] Das A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Das%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Pushparaj C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pushparaj%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Bahí N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bah%C3%AD%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Sorolla A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Sorolla%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Herreros J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Herreros%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Pamplona R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pamplona%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Vilella R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vilella%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [Matias-Guiu X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Matias-Guiu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517)., [MartíR. M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mart%C3%AD%20RM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517), [CantíC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cant%C3%AD%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22260517). Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma [J]. [Pigment Cell Melanoma Res,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260517) 2012, 25(2): 200-212.

[[25] Taylor J. T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Taylor%20JT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Huang L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Huang%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Pottle J. E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pottle%20JE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Liu K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Yang Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Zeng X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zeng%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Keyser B. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Keyser%20BM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Agrawal K. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Agrawal%20KC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Hansen J. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hansen%20JB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293)., [Li M.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Li%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18455293) Selective blockade of T-type Ca2+ channels suppresses human breast cancer cell proliferation [J]. [Cancer Lett,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Selective%2Bblockade%2Bof%2BT-type%2BCa2%2B%2Bchannels%2Bsuppresses%2Bhuman%2Bbreast%2Bcancer%2Bcell%2Bproliferation) 2008, 267(1): 116-124.

[[26] Lu F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lu%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Chen H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Zhou C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhou%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Liu S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Guo M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guo%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Chen P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chen%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Zhuang H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Zhuang%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Xie D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Xie%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042)., [Wu S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wu%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17532042). T-type Ca2+ Channel Expression in Human Esophageal Carcinomas: A Functional Role in Proliferation [J]. [Cell Calcium,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=T-type%2BCa2%2B%2BChannel%2BExpression%2Bin%2BHuman%2BEsophageal%2BCarcinomas%3A%2BA%2BFunctional%2BRole%2Bin%2BProliferation) 2008, 43(1): 49-58.

[27] Toyota M., Ho C., Ohe-Toyota M., Baylin S. B., Issa J. P. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in humantumors [J]. Cancer Res, 1999, 59(18): 4535-4541.

[28] Barnes S., Haynes L. W. Low-voltage-activated calcium channels in human retinoblastoma cells [J]. Brain Res, 1992, 598(1-2): 19-22.

[29] Bertolesi G. E., Shi C., Elbaum L., Jollimore C., Rozenberg G., Barnes S., Kelly M. E. The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms [J]. Mol Pharmacol, 2002, 62(2): 210-219.

[30] Hirooka K., Bertolesi G. E., Kelly M. E., Denovan-Wright E. M., Sun X., Hamid J., Zamponi G. W., Juhasz A. E., Haynes L. W., Barnes S. T-type calcium channel alpha1G and alpha1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation [J]. J. Neurophysiol, 2002, 88(1): 196-205.

[31] Haverstick D. M., Heady T. N., Macdonald T. L., Gray L. S. Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca2+ entry [J]. Cancer Res., 2000, 60(4): 1002-1008.

[32] Mariot P., Vanoverberghe K., Lalevee N., Rossier M. F., Prevarskaya N. Overexpression of alpha1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 10824-10833.

[33] Rossier M. F., Lesouhaiter O., Perrier E., Bockhorn L., Chiappe A., Lalevee N. Aldosterone regulation of T-type calcium channels [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 85(2-5): 383-388.

[[34] Valerie N. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Valerie%20NC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412)., [Dziegielewska B.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Dziegielewska%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412), [Hosing A. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hosing%20AS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412)., [Augustin E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Augustin%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412)., [Gray L. S.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gray%20LS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412), [Brautigan D. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brautigan%20DL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412)., [Larner J. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Larner%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23287412)., Dziegielewski J. Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in Glioblastoma cells [J]. [Biochem Pharmacol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Inhibition%2Bof%2BT-type%2Bcalcium%2Bchannels%2Bdisrupts%2BAkt%2Bsignaling%2Band%2Bpromotes%2Bapoptosis%2Bin%2Bglioblastoma%2Bcells) 2013; 85(7): 888-897.

[35] Panner A., Cribbs L. L., Zainelli G. M., Origitano T. C., Singh S., Wurster R. D. Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells [J]. Cell Calcium, 2005, 37(2): 105-119.

[36] Lijnen P., Fagard R., Petrov V. Mibefradil-induced inhibition of proliferation of human peripheral blood mononuclear cells [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 33(4): 595-604.

[37] Wondergem R., Gong W., Monen S. H., Dooley S. N., Gonce J. L., Conner T. D., Houser M., Ecay T. W., Ferslew K. E. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation [J]. J Physiol, 2001, 532(Pt3): 661-672.

[38] Nilius B, Prenen K, Kamouchi M, Viana F, Voets T, Droogmans G. Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca(2+) - and volume-activated Cl- channels in macrovascular endothelial cells [J]. Brit J Pharmacol, 1997, 121(3): 547-555.

[39] Chemin J., Monteil A., Dubel S., Nargeot J., Lory P.. The alpha1I T-type calcium channel exhibits faster gating properties when overexpressed in neuroblastoma/glioma NG 108-15 [J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(10): 1678-1686.

[40] Strobl J. S., Melkoumian Z., Peterson V. A., Hylton H. The cell death response to gamma-radiation in MCR-7 cells is enhanced by a neuroleptic drug, pimozide [J]. Breast Cancer Res Treat, 1998, 51(1): 83-95.

[41] Lee G. L., Hait W. N. Inhibition of growth of C6 astrocytoma cells by inhibition of calmodulin [J]. Life Sci, 1985, 36(4): 347-354.

[[42] Ohkubo T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ohkubo%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22469755)., [Yamazaki J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yamazaki%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=22469755). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells [J]. [Int J Oncol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469755), 2012, 41(1): 267-275.

[[43] Das A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Das%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [Pushparaj C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pushparaj%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [Herreros J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Herreros%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [Nager M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nager%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [Vilella R.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vilella%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340), [Portero M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Portero%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [Pamplona R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pamplona%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [Matias-Guiu X](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Matias-Guiu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [MartíR. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mart%C3%AD%20RM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340)., [CantíC](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cant%C3%AD%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23931340). T-type calcium channel blockers inhibit autophagy

And promote apoptosis of malignant melanoma cells [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2013, 26(6): 874-885.

**二电压门控钠通道与细胞迁移**

**摘要：**电压门控钠通道是表达于细胞质膜上的一种离子通道蛋白，在动作电位的形成和传播中发挥着重要的作用。电压门控钠通道广泛表达于具有高度侵袭性肿瘤细胞质膜上，与肿瘤细胞的迁移、侵袭关系密切。电压门控钠通道阻断剂河豚毒素显著抑制肿瘤的迁移、侵袭。

关键词：电压门控钠通道； 肿瘤； 迁移

**1. 电压门控钠通道的生理学特征**

电压门控钠通道(VGSCs)是兴奋性细胞表达量最丰富的一种离子通道蛋白，在兴奋性细胞动作电位的形成和传播中发挥着重要的作用。包括两种亚单位：α(260 KD)及β。

β亚单位包括β1、β2、β3、β4 (30-40 KD)四种亚型[1]。α亚单位是电压门控钠通道的主要功能单位，有4组同源的结构域组成，而每一个结构域是有6个跨膜的α螺旋所组成。α亚单位的6个跨膜螺旋(S1-S6)结构组成电压门控钠通道的门控中心孔。至今为止，至少发现10种编码α亚单位的基因，其中Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、

Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9属于同一家族[2-3]，根据它们对TTX的敏感性可以分为TTX-敏感性钠通道(TTX-S: Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6和Nav1.7, nM的TTX可以阻断此类钠通道)和TTX-抵抗性钠通道(TTX-R: Nav1.5, Nav1.8 和Nav1.9, 需要

µM 的TTX 才可以阻断此类钠通道，其中Nav1.8 对TTX 最不敏感，IC50 约为100

µM）。

**2. 电压门控钠通道在肿瘤的表达**

最近研究发现，VGSCs广泛表达于具有高度侵袭性肿瘤细胞质膜上，包括包括乳腺癌(BCa)[4, 5]、前列腺癌(PCa) [6]、淋巴瘤[7]、肺癌[8, 9]、间皮瘤[10]、成神经细胞瘤[11]、黑色素瘤[12]和子宫颈癌[13]。另有报道表明VGSCs 在乳腺癌、小细胞肺癌和前列腺癌发生转移

时表达上调[4, 8, 14]。同时研究还表明，VGSCs特异性阻断剂TTX可以在体外抑制与肿瘤细胞转移相关的各种生物学活动，如侵袭[15]、迁移[16]、趋向性[17]、形态发育与伸展[18]、胞吞[8]、侧向活动[19]、黏附[20]及基因表达[16]。这些研究成果表明VGSCs在肿瘤细胞迁移、侵袭过程中发挥着重要的作用，并且可以作为高度侵袭性肿瘤诊断及预后的标志物。

**3. 电压门控钠通道在肿瘤细胞表达及活性的调节**

至今为止，关于肿瘤细胞电压门控钠通道表达及活性的调节机制报道甚少，大部分结论都是属于推论性的，没有得到实验的验证。总体上来看，电压门控钠通道的表达及活性调节可以发生在转录、翻译、翻译后修饰各个环节上[21]。在一些激素依赖性组织，如子宫、卵巢、乳腺和前列腺，电压门控钠通道的表达可能受类固醇激素的调节。有一些研究报道认为生长因子，如内皮生长因子、神经生长因子可能调节肿瘤细胞电压门控钠通道的表达[22, 23, 24]。电压门控钠通道的表达也可能受活性依赖性调节。Brackenbury等[16]研究发现在Mat-LyLu细胞，Nav1.7通过正反馈机制（SCN9A转录增强，PKA 介导的电压门控钠通道向质膜上转运）表达上调。蛋白-蛋白之间的相互作用在调节电压门控钠通道活性过程中可能同样发挥着重要的作用[21, 25]。电压门控钠通道β亚单位在调节电压门控钠通道的活性中也起到了不可忽视的作用[26]。

**4. 电压门控钠通道影响细胞迁移的机制**

电压门控钠通道是如何影响细胞迁移能力的，至今仍没有得到很好的解释。根据前期的研究资料，可以归纳为两种机制[27]。一种机制是钠离子内流机制，钠离子通过电压门控钠通道进入胞内（窗电流）可以改变膜电位、细胞体积、钙稳态(通过Na+-Ca2+交换)、pH值平衡（通过Na+-H+ 交换、碳酸氢盐转运体、质子泵）以及钠离子依赖性酶（PKA、

cathepsins）活性，这些因素最后都有可能影响到细胞的迁移。另外，由于胞内离子稳态的改变(Na+、Ca2+、H+)，会激活一些重要的激酶，如PKA、PKC、CaMK、src激酶等，这些激酶可以调节细胞骨架肌动蛋白的活性从而增强肿瘤细胞小泡运输、分泌、迁移、侵袭的能力[5, 19, 28, 29, 30]。另一种机制是非电导机制，即蛋白-蛋白相互作用，电压门控钠通道α亚单位和（或）β 亚单位与质膜上、胞内蛋白相互作用从而调节细胞的迁移能力。例如，

Brackenbury等[26]研究发现电压门控钠通道β1和β2亚单位可以与粘蛋白-C、粘蛋白-R相互作用参与细胞的黏附，引起细胞聚集和锚蛋白的募集。而用小分子RNA干扰电压门控钠通道β1的表达可以增强MCF-7细胞的迁移能力[31]。

综上所述，电压门控钠通道在肿瘤细胞迁移、侵袭过程中发挥着重要的作用，而淋巴细胞有电压门控钠通道的功能表达，淋巴细胞尤其T淋巴细胞在发挥防御功能时需要迁移到靶组织，电压门控钠通道在这过程中可能扮演着重要的角色。

参考文献

[1] Chioni A. M., Brackenbury W. J., Calhoun J. D., Isom L. L., Djamgoz M. B. A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na+ channel beta1 subnit [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(5): 1216-1227.

[2] Goldin A. L. Resurgence of sodium channel research [J]. Annu Rev Physiol, 2001, 63: 871-894.

[[3] Goldin A. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Goldin%20AL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Barchi R. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Barchi%20RL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Caldwell J. H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Caldwell%20JH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Hofmann F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hofmann%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Howe J. R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Howe%20JR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Hunter J. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hunter%20JC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Kallen R. G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kallen%20RG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Mandel G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mandel%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Meisler M. H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Meisler%20MH%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Netter Y. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Netter%20YB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Noda M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Noda%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Tamkun M. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tamkun%20MM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Waxman S. G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Waxman%20SG%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Wood J. N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wood%20JN%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347)., [Catterall W. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Catterall%20WA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11144347). Nomenclature of voltage-gated sodium channels [J]. [Neuron,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144347) 2000, 28(2): 365-368.

[[4] Fraser S. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Diss J. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Diss%20JK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Chioni A. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chioni%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Mycielska M. E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mycielska%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Pan H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pan%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Yamaci R. F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yamaci%20RF%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Pani F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pani%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Siwy Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Siwy%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Krasowska M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Krasowska%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Grzywna Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Grzywna%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Brackenbury W. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brackenbury%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Theodorou D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Theodorou%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Koyutürk M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Koyut%C3%BCrk%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Kaya H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kaya%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Battaloglu E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Battaloglu%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [De Bella M. T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=De%20Bella%20MT%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Slade M. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Slade%20MJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Tolhurst R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Tolhurst%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Palmieri C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Palmieri%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Jiang J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jiang%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Latchman D. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Latchman%20DS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Coombes R. C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Coombes%20RC%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16061851). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis [J]. [Clin Cancer Res,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Voltage-gated%20sodium%20channel%20expression%20and%20potentiation%20of%20human%20breast%20cancermetastasis.%5ball%5d&amp;cmd=correctspelling) 2005, 11(15): 5381-5389.

[[5] Roger S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Roger%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14561467)., [Besson P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Besson%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14561467)., [Le Guennec J. Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Le%20Guennec%20JY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14561467). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line [J]. [Biochim Biophys Acta,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Involvement%2Bof%2Ba%2Bnovel%2Bfast%2Binward%2Bsodium%2Bcurrent%2Bin%2Bthe%2Binvasion%2Bcapacity%2Bof%2Ba%2Bbreast%2Bcancer%2Bcell%2Bline) 2003, 1616(2): 107-111.

[[6] Laniado M. E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Laniado%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978)., [Lalani E. N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lalani%20EN%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978)., [Fraser S. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978)., [Grimes J. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Grimes%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978)., [Bhangal G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bhangal%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978)., [Abel P. D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Abel%20PD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9094978). Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro [J]. [Am J Pathol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Expression%20and%20functional%20analysis%20of%20voltage-activatedNa%2B%20channels%20inhumanprostate%20cancer%20cell%20lines%20and%20their%20contribution%20to%20invasion%20in%20vitro.%5ball%5d&amp;cmd=correctspelling) 1997, 150(4): 1213-1221.

[[7] Fraser S. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632)., [Diss J. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Diss%20JK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632)., [Lloyd L. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lloyd%20LJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632)., [Pani F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Pani%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632)., [Chioni A. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chioni%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632)., [George A. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=George%20AJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15225632). T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na+ channel activity [J]. [FEBS Lett,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=T-lymphocyte%2Binvasiveness%3A%2Bcontrol%2Bby%2Bvoltage-gated%2BNa%2B%2Bchannel%2Bactivity) 2004, 569(1-3): 191-194.

[[8] Onganer P. U](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Onganer%20PU%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151702)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16151702). Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na+ channel expression in vitro [J]. [J Membr Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Small-cell%2Blung%2Bcancer%2B(human)%3A%2Bpotentiation%2Bof%2Bendocytic%2Bmembrane%2Bactivity%2Bby%2Bvoltage-gated%2BNa%2B%2Bchannel%2Bexpression%2Bin%2Bvitro) 2005, 204(2): 67-75.

[[9] Roger S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Roger%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Rollin J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Rollin%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Barascu A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Barascu%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Besson P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Besson%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Raynal P. I](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Raynal%20PI%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Iochmann S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Iochmann%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Lei M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lei%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Bougnoux P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bougnoux%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Gruel Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gruel%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016)., [Le Guennec J. Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Le%20Guennec%20JY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17307016). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines [J]. I[nt J Biochem Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Voltage-gated%2Bsodium%2Bchannels%2Bpotentiate%2Bthe%2Binvasive%2Bcapacities%2Bof%2Bhuman%2Bnon-small-cell%2Blung%2Bcancer%2Bcell%2Blines) 2007, 39(4): 774-786.

[[10] Fulgenzi G](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fulgenzi%20G%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Graciotti L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Graciotti%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Faronato M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Faronato%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Soldovieri M. V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Soldovieri%20MV%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Miceli F](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Miceli%20F%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Amoroso S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Amoroso%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Annunziato L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Annunziato%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Procopio A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Procopio%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569)., [Taglialatela M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Taglialatela%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16458569). Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility [J]. [Int J Biochem Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Human%2Bneoplastic%2Bmesothelial%2Bcells%2Bexpress%2Bvoltage-gated%2Bsodium%2Bchannels%2Binvolved%2Bin%2Bcell%2Bmotility) 2006, 38(7): 1146-1159.

[[11] Ou S. W.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ou%20SW%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203), [Kameyama A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kameyama%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203)., [Hao L. Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hao%20LY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203)., [Horiuchi M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Horiuchi%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203)., [Minobe E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Minobe%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203)., [Wang W. Y.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20WY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203), [Makita N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Makita%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203)., [Kameyama M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kameyama%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16115203). Tetrodotoxin-resistant Na+ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A [J]. [Eur J Neurosci,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tetrodotoxinresistant%2BNa%2B%2Bchannels%2Bin%2Bhuman%2Bneuroblastoma%2Bcells%2Bare%2Bencoded%2Bby%2Bnew%2Bvariants%2Bof%2BNav1%2C%2B5%2FSCN5A) 2005, 22(4): 793-801.

[12] Allen D. H., Lepple-Wienhues A., Cahalan M. D. Ion channel phenotype of melanoma cell lines [J]. J Membr Biol, 1997, 155(1): 27-34.

[13] Diaz D., Delgadillo D. M., Hernández -Gallegos E., Ramríez -Domníguez M. E., Hinojosa L. M., Ortiz C. S., Berumen J., Camacho J., Gomora J. C. Functional expression of voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer [J]. J Cell Physiol, 2007, 210(2): 469-478.

[14] Diss J. K., Stewart D., Pani F., Foster C. S., Walker M. M., Patel A., Djamgoz M. B. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005, 8(3): 266-273.

[[15] Bennett E. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bennett%20ES%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14677067)., [Smith B. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smith%20BA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14677067), [Harper J. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Harper%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14677067). Voltage-gated Na+ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells [J]. [Pflugers Arch,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Voltage-gated%2BNa%2B%2Bchannels%2Bconfer%2Binvasive%2Bproperties%2Bon%2Bhuman%2Bprostate%2Bcancer%2Bcells) 2004, 447(6): 908-914.

[16] Brackenbury W. J., Djamgoz M. B. Activity-dependent regulation of voltage-gated Na+ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line [J]. J Physiol, 2006, 573(Pt 2): 343-356.

[[17] Djamgoz M. B. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MBA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11683396)., [Mycielska M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mycielska%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11683396)., [Madeja Z](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Madeja%20Z%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11683396)., [Fraser S. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11683396)., [Korohoda W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Korohoda%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11683396). Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na+ channel activity [J]. [J Cell Sci,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Directionalmovement%20of%20rat%20prostate%20cancer%20cells%20in%20direct-current%20electric%20field%3A%20involvement%20of%20voltage%20gated%20Na%2B%20channel%20activity%5ball%5d&amp;cmd=correctspelling) 2001, 114(Pt 14): 2697-2705.

[[18] Fraser S. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10022970)., [Ding Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Ding%20Y%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10022970)., [Liu A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Liu%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10022970)., [Foster C. S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Foster%20CS%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10022970)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10022970). Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line [J]. [Cell Tissue Res,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tetrodotoxin%2Bsuppresses%2Bmorphological%2Benhancement%2Bof%2Bthe%2Bmetastatic%2BMAT-LyLu%2Brat%2Bprostate%2Bcancer%2Bcell%2Bline) 1999, 295(3): 505-512.

[[19] Fraser S. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Salvador V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Salvador%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Manning E. A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Manning%20EA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Mizal J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mizal%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Altun S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Altun%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Raza M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Raza%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Berridge R. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Berridge%20RJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12704658). Contribution of functional voltage-gated Na+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. lateral motility [J]. [J Cell Physiol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Contribution%2Bof%2Bfunctional%2Bvoltage-gated%2BNa%2B%2Bchannel%2Bexpression%2Bto%2Bcell%2Bbehaviors%2Binvolved%2Bin%2Bthe%2Bmetastatic%2Bcascade%2Bin%2Brat%2Bprostate%2Bcancer%3A%2BI.%2Blateral%2Bmotility) 2003, 195(3): 479-487.

[[20] Palmer C. P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Palmer%20CP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Mycielska M. E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mycielska%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Burcu H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Burcu%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Osman K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Osman%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Collins T](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Collins%20T%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Beckerman R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Beckerman%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Perrett R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Perrett%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Johnson H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Johnson%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Aydar E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Aydar%20E%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17879092). Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na+ channel expression [J]. [Eur Biophys J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Single%2Bcell%2Badhesion%2Bmeasuring%2Bapparatus%2B(SCAMA)%3A%2Bapplication%2Bto%2Bcancer%2Bcell%2Blines%2Bof%2Bdifferent%2Bmetastatic%2Bpotential%2Band%2Bvoltage-gated%2BNa%2B%2Bchannel%2Bexpression) 2008, 37(4): 359-368.

[[21] Diss JK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Diss%20JK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14963621), [Fraser SP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fraser%20SP%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14963621), [Djamgoz MB](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=14963621). Voltage-gated Na+ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects [J]. [Eur Biophys J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Diss%2BAND%2BEur.%2BBiophys.%2BJ.%2B33%2C%2B180%E2%80%93193) 2004, 33(3): 180-193.

[[22] Kraft R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kraft%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11284020)., [Basrai D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Basrai%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11284020)., [Benndorf K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Benndorf%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11284020)., [Patt S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Patt%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11284020). Serum deprivation and NGF induce and modulate voltage-gated Na+ currents in human astrocytoma cell lines [J]. [Glia,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Serum%2Bdeprivation%2Band%2BNGF%2Binduce%2Band%2Bmodulate%2Bvoltage-gated%2BNa%2B%2Bcurrents%2Bin%2Bhuman%2Bastrocytoma%2Bcell%2Blines) 2001, 34(1): 59-67.

[[23] Brackenbury W. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brackenbury%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17149708)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17149708). Nerve growth factor enhances voltage-gated Na+ channel activity and Transwell migration in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line [J]. J Cell Physiol, 2007, 210(3): 602-608.

[[24] Uysal-Onganer P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Uysal-Onganer%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18036246)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18036246). Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3 M cells: involvement of voltage-gated sodium channel [J]. [Mol Cancer,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Epidermal%2Bgrowth%2Bfactor%2Bpotentiates%2Bin%2Bvitro%2Bmetastatic%2Bbehaviour%2Bof%2Bhuman%2Bprostate%2Bcancer%2BPC-3%2BM%2Bcells%3A%2Binvolvement%2Bof%2Bvoltage-gated%2Bsodium%2Bchannel) 2007, 6: 76.

[[25] Shao D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Shao%20D%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19401147)., [Okuse K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Okuse%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19401147)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19401147). Protein–protein interactions involving voltage-gated sodium channels: post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression [J]. [Int J Biochem Cell Biol.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Protein%E2%80%93protein%2Binteractions%2Binvolving%2Bvoltage-gated%2Bsodium%2Bchannels%3A%2Bpost-translational%2Bregulation%2C%2Bintracellular%2Btrafficking%2Band%2Bfunctional%2Bexpression), 2009, 41(7): 1471-1481.

[[26] Brackenbury W. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brackenbury%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18940784)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18940784)., [Isom L. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Isom%20LL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18940784). An emerging role for voltage-gated Na+ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers [J]. [Neuroscientist,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=An%2Bemerging%2Brole%2Bfor%2Bvoltage-gatedNa%2B%2Bchannels%2Bin%2Bcellular%2Bmigration%3A%2Bregulation%2Bof%2Bcentral%2Bnervous%2Bsystemdevelopment%2Band%2Bpotentiation%2Bof%2Binvasive%2Bcancer) 2008, 14(6): 571-583.

[[27] Onkal R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Onkal%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19835862)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19835862). Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer [J]. [Eur J Pharmacol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Molecular%2Bpharmacology%2Bof%2Bvoltage-gated%2Bsodium%2Bchannel%2Bexpression%2Bin%2Bmetastatic%2Bdisease%3A%2BClinical%2Bpotential%2Bof%2Bneonatal%2BNav1.5%2Bin%2Bbreast%2Bcancer) 2009, 625(1-3): 206-219.

[[28] Mycielska M. E](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mycielska%20ME%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15075225)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15075225). Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease [J]. [J Cell Sci,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cellular%2Bmechanisms%2Bof%2Bdirect-current%2Belectric%2Bfield%2Beffects%3A%2Bgalvanotaxis%2Band%2Bmetastatic%2Bdisease) 2004, 117(Pt 9): 1631-1639.

[[29] Roger S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Roger%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17073667)., [Potier M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Potier%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17073667)., [Vandier C](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Vandier%20C%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17073667)., [Besson P](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Besson%20P%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17073667)., [Le Guennec J. Y](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Le%20Guennec%20JY%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17073667). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy [J] [CurrPharmDes,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Voltage-gated%2Bsodium%2Bchannels%3A%2Bnew%2Btargets%2Bin%2Bcancer%2Btherapy%3F) 2006, 12(28): 3681-3695.

[[30] Brackenbury W. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brackenbury%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16838113)., [Chioni A. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chioni%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16838113)., [Diss J. K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Diss%20JK%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16838113)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=16838113). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. [Breast Cancer Res Treat,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2Bneonatal%2Bsplice%2Bvariant%2Bof%2BNav1.5%2Bpotentiates%2Bin%2Bvitro%2Binvasive%2Bbehaviour%2Bof%2BMDA-MB-231%2Bhuman%2Bbreast%2Bcancer%2Bcells) 2007, 101(2): 149-160.

[[31] Chioni A. M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Chioni%20AM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19041953)., [Brackenbury W. J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brackenbury%20WJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19041953)., [Calhoun J. D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Calhoun%20JD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19041953)., [Isom L. L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Isom%20LL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19041953)., [Djamgoz M. B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Djamgoz%20MB%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19041953). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na+ channel beta1 subunit [J]. [Int J Biochem Cell Biol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A%2Bnovel%2Badhesion%2Bmolecule%2Bin%2Bhuman%2Bbreast%2Bcancer%2Bcells%3A%2Bvoltage-gated%2BNa%2B%2Bchannel%2Bbeta1%2Bsubunit) 2009, 41(5): 1216-1227.

致 **谢**

值此博士论文完成之际，我首先要衷心感谢我的导师陈元仲教授三年来的悉心培养。您的谆谆教导使我能够在学习和工作中不断取得进步，科研思维得到了极大的提升，并能真正体会到科研工作中的乐趣。您严谨的治学态度，广博的学识将使我终生受益。师恩难忘，谨向您表示最诚挚的谢意！衷心祝愿您身体健康，工作顺利，生活愉快！

衷心感谢我的指导老师吴勇教授，感谢您多年来对我的关爱和照顾，感谢您孜孜不倦的教导我如何做一名好学生、好医生。当我彷徨低落时，是您鼓励我奋发向上；当我在科学的殿堂中步履蹒跚时，是您指点我不断坚持。您对专业学术的孜孜以求和精益求精令学生敬佩；您严谨的治学态度和对工作的热情是学生终身学习的榜样。值此，请允许我向您致以深深的谢意！

感谢福医大基础学院分子生物学林旭教授、药学院许建华教授对本课题提出的宝贵意见和建议；感谢协和医院血液科战榕教授、胡建达教授、王少元教授、林艳娟教授、杨凤娥副教授、黄美娟副教授、陈鑫基副教授等老师在临床和科研工作中给予我的悉心照顾和指导。

感谢福医大协和医院基因工程实验室主管技师林振兴老师在实验过程中给予的支持和鼓励，感谢杨娜、吴正军技师的帮助。感谢福医大研究生处潘涛老师、梁飞琴老师给予我的关心照顾。

衷心感谢我的同门师兄弟郑晓辉、陈萍、郭江睿、李鑫、宋清晓、徐淑娟、陈莹莹、陈美玲、郭雅斐、耿海丽、林玲等对我工作和生活的照顾与支持。

此外，我要特别感谢我父母多年来的养育和支持，感谢他们对我生活无微不至的关怀和照顾，感谢我的爱人与儿子的支持与理解，使我今天能够完成博士的学习和研究。最后，谨向百忙之中抽出时间评审本论文的专家和教授致以最诚挚的敬意。同时也

向所有曾给予我帮助和关心的老师、同学和朋友们表示衷心的感谢！