

研究论文

LRRC8A细胞模型的构建及其生理特性研究

周雁红¹, 郑锴², 夏忠雪¹, 姜晓明³, 狄文慧¹, 徐连秀¹, 应超¹, 郝峰^{1,*}

吉林医药学院¹检验学院; ²管理学院, 吉林 132013; ³北华大学药学院, 吉林 132013

摘要: 本文旨在构建容积调控性阴离子通道主要成分LRRC8A的细胞模型, 并应用该模型研究LRRC8A的生理特性。构建LRRC8A和YFP-H148Q/I152L真核表达载体, 应用脂质体转染、抗生素筛选和有限稀释, 获取共表达LRRC8A和YFP-H148Q/I152L的Fischer大鼠甲状腺滤泡上皮(Fischer rat thyroid, FRT)细胞。倒置荧光显微镜观察目的基因表达情况, 荧光淬灭动力学实验检测LRRC8A和YFP-H148Q/I152L的功能。获得用于研究LRRC8A容积调控性阴离子通道的细胞模型, 并应用该细胞模型研究LRRC8A的生理特性, 包括阴离子转运特性、渗透压对LRRC8A的开放、阴离子转运速度的影响以及氯离子通道抑制剂对LRRC8A的作用。结果显示: (1)成功获得共表达LRRC8A和YFP-H148Q/I152L的FRT细胞, 该细胞模型可用于LRRC8A容积调控性氯离子通道生理特性的研究。(2)在低渗状态下, LRRC8A容积调控性阴离子通道激活, 可转运阴离子, 如: 碘离子和氯离子等; YFP-H148Q/I152L可用于研究阴离子的转运速度; 渗透压是LRRC8A容积调控性阴离子通道开放的调控因素, 其开放与渗透压呈负相关; 氯离子通道抑制剂对LRRC8A通道的转运功能具有抑制作用, 并呈剂量依赖关系。上述结果提示, 本研究成功构建LRRC8A细胞模型, 且应用该模型研究显示LRRC8A具有经典的容积调控性阴离子通道的特性。

关键词: LRRC8A; 容积调控性阴离子通道; 渗透压; FRT细胞

中图分类号: Q291

Establishment and application of a cell model for LRRC8A physiological characteristic study

ZHOU Yan-Hong¹, ZHENG Kai², XIA Zhong-Xue¹, JIANG Xiao-Ming³, DI Wen-Hui¹, XU Lian-Xiu¹, YING Chao¹, HAO Feng^{1,*}

¹Laboratory Medical College; ²Management College, Jilin Medical College, Jilin 132013, China; ³Pharmacy College, Beihua University, Jilin 132013, China

Abstract: The aim of the present study was to establish a cell model of volume-regulated anion channel subunit LRRC8A and investigate the physiological characteristics of LRRC8A. The eukaryotic expression vectors of LRRC8A and YFP-H148Q/I152L were constructed and transfected into Fischer rat thyroid (FRT) cells by Lipofectamine 2000. The FRT cell lines co-expressing LRRC8A and YFP-H148Q/I152L were obtained by antibiotic screening. The expression of LRRC8A and YFP-H148Q/I152L in FRT cells was detected by the inverted fluorescence microscope. The fluorescence quenching kinetic experiment was done to verify the function and effectiveness of the cell model. Then the cell model was utilized to study the physiological characteristics of LRRC8A, such as the characteristics of anion transport, the opening of LRRC8A by osmotic pressure, the effect of anion transport velocity, and the effect of chloride channel inhibitors on LRRC8A anion channel. The results of the inverted fluorescence microscope showed that LRRC8A was expressed on the cell membrane and YFP-H148Q/I152L was expressed in the cytoplasm. The results of fluorescence quenching kinetic

Received 2018-08-29 Accepted 2019-03-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81601234), the Scientific Project of Education Department of Jilin Province, China (No. JJKH20170418KJ, JJKH20191056KJ), the Sanitation and Health Technology Innovation Project, Jilin Province, China (No. 2018J113), the Start Funding of Jilin Medical University (No. 2017KYQD001) and the National Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of China (No. 201613706020, 201713743004).

*Corresponding author. Tel: +86-432-64561069; E-mail: haof863@126.com

test showed that under the condition of low osmotic state, LRRC8A could transport some kinds of anions, such as iodine and chloride ions. Osmotic pressure played a key role in the regulation of LRRC8A volume-regulated anion channel opening. Chloride channel inhibitors inhibited ion transport of LRRC8A channel in a dose-dependent manner. It is suggested that LRRC8A has the characteristics of classic volume-regulated anion channels by using the cell model of FRT cells co-expressing LRRC8A and YFP-H148Q/I152L.

Key words: LRRC8A; volume-regulated anion channels; osmotic pressure; FRT cells

容积调控性阴离子通道 (volume-regulated anion channels, VRAC) 普遍存在于各种哺乳动物细胞, 不仅在调节细胞容积动态平衡、细胞自身内环境稳态、细胞电生理、细胞增殖与分化以及细胞凋亡等多种生命活动中发挥重要作用^[1-3], 并且与多种疾病的发生密切相关, 如: 肿瘤、心肌缺血、心律失常等^[4, 5]。近年来 Voss 和 Ullrich 等人发现 *LRRC8A* 是 VRAC 的编码基因, 其编码表达的蛋白质 LRRC8A 是构成 VRAC 必不可少的一个亚基^[6, 7], 且据此开展了一系列针对性的研究, 研究证实 LRRC8A 参与运输代谢物或药物和细胞外信号转导, 阴离子通道阻滞剂可抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移, 且有助于调节细胞容积, 维持细胞正常生理功能^[1], 但 LRRC8A 在细胞凋亡方面的作用机制尚不清楚, 对于它的生理特性的研究也还处于初级阶段^[8]。

电生理技术是研究离子通道的金标准, 但需要特定的仪器设备, 对技术人员要求较高, 尤其不适合离子通道小分子调节剂高通量筛选。为此有学者应用放射性 ³⁶Cl 研究囊性纤维化跨膜电导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 氯离子通道功能, 后期发展为应用氯离子敏感的荧光染料反映氯离子通道的开放和关闭情况^[9]。但这些方法不仅需要特殊的材料和困难的技术条件, 而且要将荧光染料转载至细胞内, 一次实验结束后还需要重新制备样本, 限制了这些方法的应用和推广^[10]。绿色荧光蛋白可在细胞内长久表达, 其相对荧光强度高, 重复性好。黄色荧光蛋白是在此基础上建立的一种荧光蛋白, 其荧光信号是绿色荧光蛋白的数倍。本研究小组在前期工作中建立了卤族元素敏感黄色荧光蛋白突变体 YFP-H148Q/I152L 的细胞模型, 并用其检测钙激活氯离子通道的生理功能, 取得了理想结果, 为后期研究 VRAC 等氯离子通道功能奠定了良好基础^[11]。本研究构建了共表达 YFP-H148Q/I152L 和 LRRC8A 的细胞模型, 用于研究 LRRC8A 的某些生理特性, 包括转运阴离子的特性、渗透压对 LRRC8A 的开放情况、阴离子转运速度的影响以及氯离子通道抑制剂对

LRRC8A 阴离子通道的作用。该细胞模型可反复传代, 重复性好, 具有经济、简便、快速和灵敏的特点。该方法的建立为后续 VRAC 调节剂筛选、及其关键碱基和氨基酸的发现、VRAC 与某些生理活动和病理机制的内在联系等研究奠定了良好基础, 有利于阐明 LRRC8A 影响肿瘤细胞恶性生物学行为的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 大鼠甲状腺滤泡上皮 (Fischer rat epithelial, FRT) 细胞由中国科学院应用化学研究所关新刚教授馈赠; *LRRC8A* 真核表达载体和 *YFP-H148Q/I152L* 真核表达载体由本实验室前期构建; 所用引物由金唯智生物科技有限公司合成; Lipofectamine 2000 脂质体、潮霉素 B (Hygromycin B)、G418 抗生素、TRIZOL 和 RT-PCR 试剂购自 Invitrogen 公司; F-12 营养培养基、尼氟灭酸 (niflumic acid, NFA) 和 5-硝基-2-3 苯酚丙胺苯甲酸盐 [5-nitro-2(3-phenylpropylamino)benzoate, NPPB] 购自 Sigma 公司。

1.2 主要仪器 Fluo star 多功能酶标仪 (BMG)、倒置荧光显微镜 (Nikon)、CO₂ 培养箱、超纯水机、凝胶成像仪、PCR 仪、Nanodrop 2000 微量分光光度计。

1.3 细胞模型的构建 —— 构建共表达 LRRC8A 和 YFP-H148Q/I152L 的 FRT 细胞株

由本实验室构建 LRRC8A 真核表达载体 (pCMV3-*LRRC8A*, 在 *LRRC8A* 的 C 端融合表达红色荧光蛋白 RFP, 启动子为 CMV) 和 *YFP-H148Q/I152L* 真核表达载体 (是黄色荧光蛋白的双突变体, 突变后不仅具有极强的碘离子敏感特性, 当遇到体液中含量极少的碘离子时发生显著性荧光信号降低, 即荧光淬灭, 而且具有对其它卤族元素如体液中含量最高的氯离子等阴离子不敏感的特性, 因此是适宜用作反映氯离子通道开放情况的工具), 按照 Lipofectamine 2000 说明书将 pCMV3-*LRRC8A* 转入 FRT 细胞, 潮霉素 B 抗生素筛选, 挑取倒置荧光显微镜下细胞膜可见红色

荧光的 FRT 细胞克隆,有限稀释后保存阳性细胞株,连续传代三次仍可见百分之百细胞膜红色荧光的 FRT 细胞为稳定表达 LRRC8A 的阳性细胞株,扩大培养。将 *YFP-H148Q/I152L* 转入已表达 LRRC8A 的 FRT 细胞,用 G418 抗生素筛选,挑取倒置荧光显微镜下胞浆可见绿色荧光信号的 FRT 细胞克隆,具体步骤同上,获得 LRRC8A 和 *YFP-H148Q/I152L* 共表达的 FRT 细胞株。

1.4 RT-PCR 电泳鉴定 FRT 细胞中表达 LRRC8A~E 的组分 选取生长状态良好的 FRT 细胞株,加入 TRIzol,按照试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。以此 cDNA 为模板,设计 *LRRC8A~E* 编码区特异性引物,PCR 扩增目的片段。将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。*LRRC8A* 上下游引物:5'-GGAGGGCCAAGGCTGC-3',5'-ACCCTGAGATGGCTCTGCTA-3';*LRRC8B* 上下游引物:5'-CAGTACTTCG-CCGTGACCAA-3',5'-CCAATGAGTTCCA-GGTGGGT-3';*LRRC8C* 上下游引物:5'-CCCCAGAGATTAATGTGGCTG-3',5'-CGGAACTCGGTCCTGGAAT-3';*LRRC8D* 上下游引物:5'-TGAGGGATCTAAGGCTCGGA-3',5'-AGCAACTTCCGCAAGGGTAA-3';*LRRC8E* 上下游引物:5'-CATCCCAGAGCAACAGGATGAT-3',5'-GGGAAGTACTTGGCGTACCA-3'。目标产物分别为 157、158、106、153 和 370 bp。

1.5 细胞模型的鉴定 在倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 荧光淬灭动力学实验鉴定细胞模型有效性

将实验分为低渗状态组和对照组两组,每组设置 3 个复孔。低渗状态组:选取传代 3 次后密度达到 80%~90% 的 10 cm 板 FRT 细胞(共表达 LRRC8A 与 *YFP-H148Q/I152L* 的 FRT 细胞和仅稳定转染 *YFP-H148Q/I152L* 的 FRT 细胞),传代到 96 孔板,用 PBS 清洗 3 遍去除杂质,PBS 全部吸出后加入 50 μ L 超纯水,隔 2 s 注入碘离子 PBS 缓冲液(由酶标仪完成),记录相对荧光强度动态变化。对照组:PBS 全部吸出后加入 50 μ L PBS 缓冲液,隔 2 s 注入碘离子 PBS 缓冲液(由酶标仪完成),记录相对荧光强度动态变化。具体设置如下:激发光波长 500 nm,发射光波长 540 nm。以每秒 5 个点的速度动态检测相对荧光强度,其中前 2 s 为基线,2 s 后以 280 μ L/s 的速度向目标孔中注入 120 μ L 碘离子 PBS 缓冲液。137 mmol/L 碘离子 PBS 缓冲液的

配方如下:NaI 10.27 g、KCl 0.1 g、CaCl₂ 0.055 g、MgCl₂ 0.051 g、Na₂HPO₄ 0.575 g、KH₂PO₄ 0.102 g,加入超纯水中,定容至 500 mL。

1.7 检测 LRRC8A 离子通道转运阴离子的生理特性

用含钙镁离子的 PBS 洗涤细胞 3 次,PBS 全部吸出后加入超纯水 50 μ L,隔 2 s 加入一定浓度的含有碘离子 PBS 缓冲液(由酶标仪完成),记录相对荧光强度动态变化。

1.8 检测渗透压对 LRRC8A 阴离子通道转运碘离子功能的影响

不同渗透压溶液的配制:等渗 310 mOsm/kg、倍比稀释获得 155 mOsm/kg、77.5 mOsm/kg 等等,用含钙镁离子的 PBS 洗涤细胞 3 次,PBS 全部吸出后加入超纯水 50 μ L,用酶标仪注入不同浓度低渗的碘离子 PBS 缓冲液,记录相对荧光强度动态变化。

1.9 检测渗透压对 LRRC8A 阴离子通道开放的调控作用

将实验分为调节渗透压组和对照组两组,每组设置 3 个复孔。调节渗透压组:PBS 全部吸出后加入 50 μ L 超纯水,隔 2 s 注入 2 \times PBS,再隔 2 s 注入碘离子 PBS 缓冲液(由酶标仪完成),记录相对荧光强度动态变化。对照组:PBS 全部吸出后加入 50 μ L 超纯水,隔 2 s 加入碘离子 PBS 缓冲液(由酶标仪完成),记录相对荧光强度动态变化。

1.10 检测氯离子通道抑制剂对 LRRC8A 阴离子通道的作用

将实验分为 A、B 两组,每组设置三个复孔。不同浓度 NFA 的配制:300 μ mol/L、倍比稀释获得 150 μ mol/L、75 μ mol/L、38 μ mol/L、19 μ mol/L。不同浓度 NPPB 的配制:1 200 μ mol/L、倍比稀释获得 600 μ mol/L、300 μ mol/L、150 μ mol/L、75 μ mol/L、38 μ mol/L、19 μ mol/L。A 组(先抑制后开放):用含钙镁离子的 PBS 洗涤细胞 3 次,留 50 μ L PBS,由酶标仪注入不同浓度的 NFA 或 NPPB,孵育 10 min 后吸出,加入 50 μ L 超纯水,隔 2 s 注入碘离子 PBS 缓冲液,记录相对荧光强度动态变化。B 组(先开放后抑制):用含钙镁离子的 PBS 洗涤细胞 3 次后,液体全部吸出,加入 50 μ L 超纯水,由酶标仪注入不同浓度的 NFA(或 NPPB),后续步骤与 A 组实验相同。

1.11 统计学处理 细胞膜上 LRRC8A 通道对碘离子转运的活性用相对荧光强度数值与时间变化曲线反映。以 SPSS15.0 软件分析,数据以 mean \pm SD 表示,组间比较用单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞模型构建结果

倒置荧光显微镜下观察：可见 FRT 细胞膜上有红色荧光，结果显示 LRRC8A 表达在细胞膜上，见图 1B、图 1D；同时胞浆内可见清晰的绿色荧光信号，结果表明黄色荧光蛋白双突变体表达在胞浆中，见图 1C、图 1D。结果表明，成功获得稳定共表达 LRRC8A 和 YFP-H148Q/I152L 的 FRT 细胞株。

2.2 细胞模型有效性鉴定结果

多功能酶标仪荧光淬灭动力学实验结果显示：用低渗溶液后，加入 NaI 的 PBS 缓冲液，仅稳定转染 YFP-H148Q/I152L 的 FRT 细胞荧光淬灭，相对荧光强度显著下降，结果提示容积调控性氯离子通道开放，碘离子内流；对照组实验中用等渗溶液，加入 NaI 的 PBS 缓冲液后，仅稳定转染 YFP-H148Q/I152L 的 FRT 细胞相对荧光强度无显著变化，结果

提示 LRRC8A 阴离子通道不开放 (图 2A)；共表达 LRRC8A 与 YFP-H148Q/I152L 的 FRT 细胞荧光淬灭，相对荧光强度显著下降幅度更强烈，结果提示容积调控性氯离子通道开放，碘离子内流，各组之间转运离子速度具有显著性差异 (图 2B)。结果表明，FRT 细胞内源性表达容积调控性氯离子通道，但是淬灭结果显著性低于过表达 LRRC8A 的 FRT 细胞。过表达 LRRC8A 后的 FRT 细胞展现出更强的容积调控性氯离子通道的特性，进一步证实 LRRC8A 是容积调控性氯离子通道或 LRRC8A 是氯离子通道重要的组成部分，说明本实验成功获得了可用于研究 LRRC8A 生理特性的细胞模型。

2.3 LRRC8A 离子通道转运阴离子的生理特性

用低渗溶液刺激 LRRC8A 后，加入含 NaI 的 PBS 缓冲液，相对荧光强度显著下降 (图 2A)，提示 LRRC8A 开放，碘离子 (或氯离子) 内流。结果

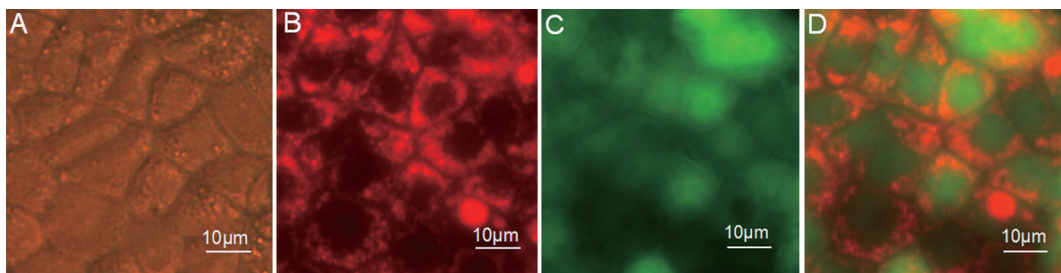


图 1. 细胞模型的鉴定结果

Fig. 1. Identification of cell models. A: FRT cells. B: The expression of LRRC8A in FRT cells. C: The expression of YFP-H148Q/I152L in FRT cells. D: Merge. Scale bar, 10 μm .

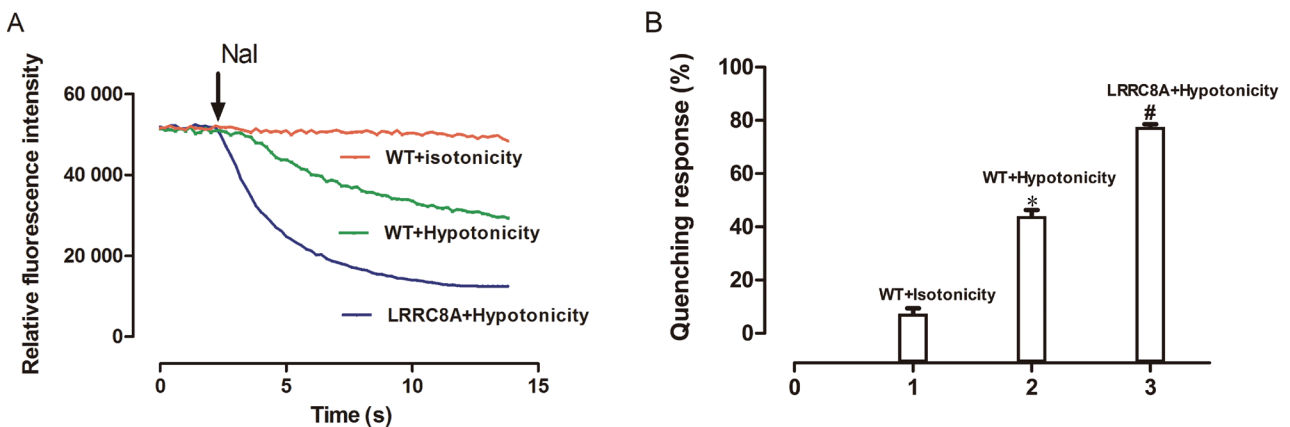


图 2. 荧光淬灭动力学实验检测 LRRC8A 通道的开放情况

Fig. 2. The opening of LRRC8A channel detected by fluorescence quenching kinetics test. A: Detection of the opening of LRRC8A in hypotonicity or isotonicity. B: Fluorescence quenching percentage of YFP. 1: FRT cells transfected with YFP-H148Q/I152L in isotonicity. 2: FRT cells stably transfected with YFP-H148Q/I152L in hypotonicity. 3: FRT cells stably transfected with YFP-H148Q/I152L and LRRC8A in hypotonicity. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs WT+isotonicity group; # $P < 0.05$ vs WT+hypotonicity group.

表明, LRRC8A 容积调控性阴离子通道具有转运阴离子如碘离子等的生理功能。

2.4 FRT细胞中内源性LRRC8A~E组分的表达

RT-PCR 电泳结果显示, 1~5 泳道分别在 157、158、106、153 和 370 bp 附近出现对应的特异性条带, 管家基因 β -actin 在对应的泳道出现 260 bp 的条带, 与预期的目的片段大小相符 (图 3)。结果表明, FRT 细胞内源性表达 LRRC8A~E。

2.5 渗透压对LRRC8A阴离子通道转运碘离子的影响

改变细胞渗透压, 当其趋于等渗时, 相对荧光强度变化幅度减小 (图 4A、图 4C), 提示 LRRC8A 开放程度减小, 碘离子的转运速率减小。结果表明, LRRC8A 转运碘离子的速率与细胞的渗透压有关, 渗透压越高, 转运速率越低, 在细胞渗透压达到 310 mOsm/kg 时, 转运速率最低。

2.6 渗透压对LRRC8A阴离子通道的开放起调控性作用

用低渗溶液刺激 LRRC8A 时, 加入含碘离子 PBS 缓冲液, 荧光淬灭, 相对荧光强度显著下降。当 LRRC8A 开放时, 加入 $2 \times$ PBS, 相对荧光强度不发生显著变化 (图 4B), 提示细胞恢复等渗状态时 LRRC8A 关闭。结果表明, 渗透压对 LRRC8A 阴离子通道的开放起调控性作用。

2.7 氯离子通道抑制剂对LRRC8A容积性阴离子通道开放的作用

A 组 (先抑制后开放): 细胞等渗时, 加入不同浓度氯离子通道抑制剂 NFA 或 NPPB 孵育, 用低渗溶液刺激 LRRC8A, 再加入含 NaI 的 PBS 缓冲液, 相对荧光强度产生不同幅度的减少 (图 5A、5B), 提示荧光淬灭强度与氯离子通道抑制剂浓度有关。结果表明, LRRC8A 开放程度与氯离子通道抑制剂

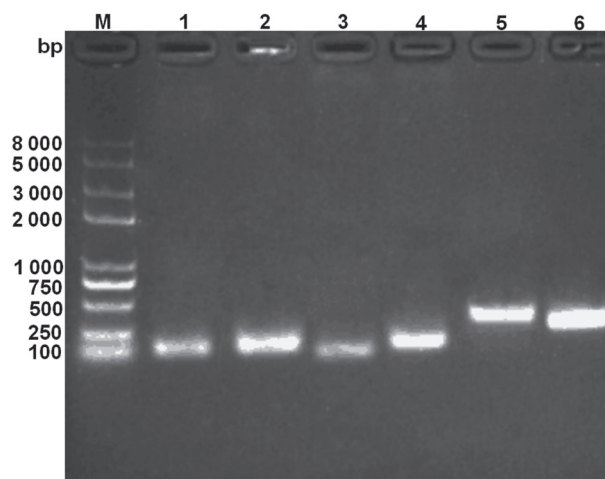


图 3. RT-PCR 鉴定 FRT 细胞内源性表达 LRRC8A~E
Fig. 3. Identification of endogenous expression of LRRC8A~E in FRT cells by RT-PCR. M: Marker; 1-5: LRRC8A~E; 6: β -actin.

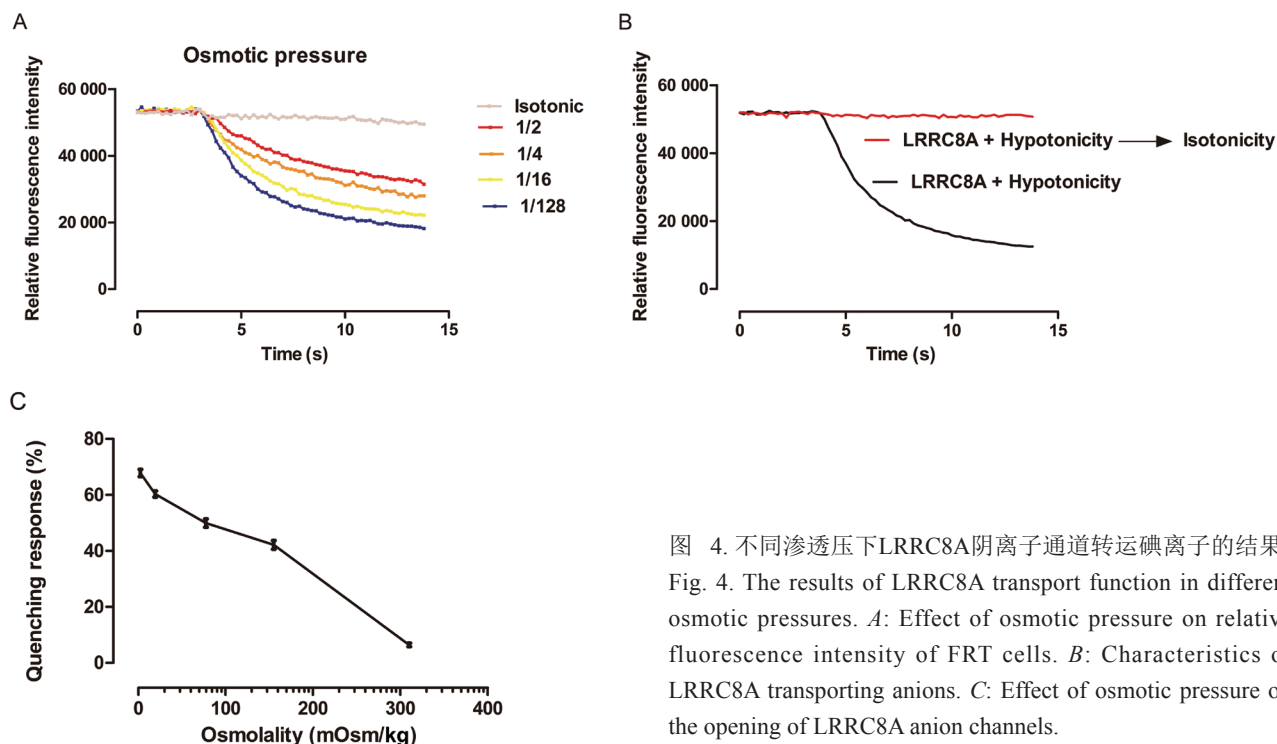


图 4. 不同渗透压下 LRRC8A 阴离子通道转运碘离子的结果
Fig. 4. The results of LRRC8A transport function in different osmotic pressures. A: Effect of osmotic pressure on relative fluorescence intensity of FRT cells. B: Characteristics of LRRC8A transporting anions. C: Effect of osmotic pressure on the opening of LRRC8A anion channels.

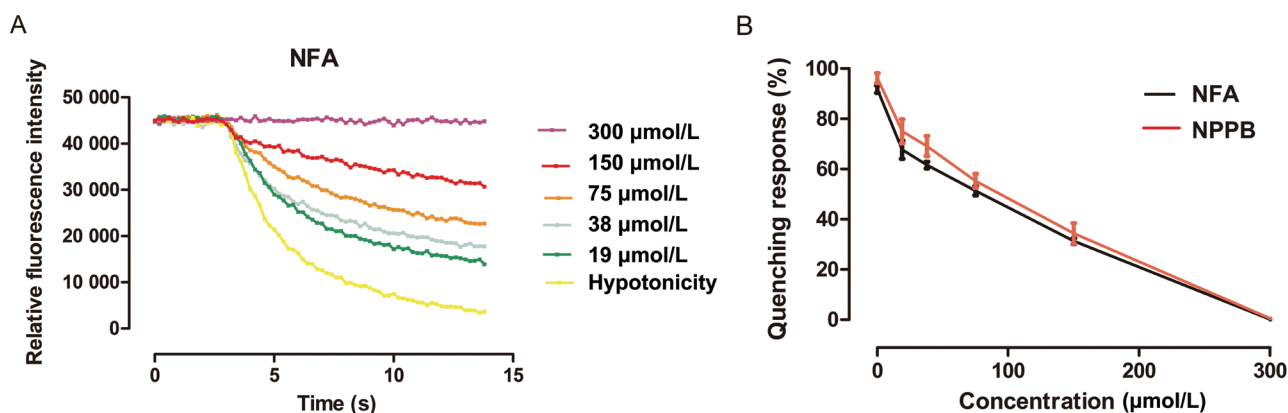


图 5. 氯离子通道抑制剂对LRRC8A的作用

Fig. 5. The effects of chloride channel inhibitors on LRRC8A. *A*: Effect of different concentration of NFA on inhibition of LRRC8A opening by fluorescence quenching kinetic test. *B*: Effect of different concentration of NFA or NPPB on the anion transport function of LRRC8A.

浓度有关，抑制剂浓度越高，抑制程度越大。

B组(先开放后抑制): 细胞低渗时，同样加入不同浓度的氯离子通道抑制剂 NFA 或 NPPB 孵育，低渗溶液刺激 LRRC8A，产生的结果也同 A 组实验结果一致，即相对荧光强度产生不同幅度的减少。综合 A 组和 B 组的结果，LRRC8A 在等渗与低渗状态下相对荧光强度变化幅度相同，提示不同渗透压下，抑制剂浓度相同时，抑制的程度相同，即 LRRC8A 的开放程度相同。结果表明，LRRC8A 开放程度的变化是其特异性抑制剂的作用，而不是抑制剂导致渗透压变化所致。

3 讨论

近年来，VRAC 受到越来越多国内外学者的关注。VRAC 在维持细胞体积以应对渗透压挑战方面起着中心作用^[12]。LRRC8A 被确认为 VRAC 的重要组成部分，并普遍存在于各种哺乳动物细胞，与其它多达 4 个 LRRC8 亚基组装成 800 kDa 的多相复合物。当被重组为双层时，LRRC8 复合物足以形成由渗透压梯度激活的阴离子通道^[13]。膜片钳等电生理技术是研究离子通道的金标准，但因实验设备、技术和人员等原因极大限制了其应用，后期有学者应用放射性 ³⁶Cl 和氯离子敏感的荧光染料研究氯离子通道功能，也因需特殊材料或者困难的技术条件等原因未得到广泛的应用和推广。黄色荧光蛋白荧光信号是绿色荧光蛋白的数倍，其双突变体 YFP-H148Q/I152L 具有极强的卤族元素敏感的特点，基于检测 YFP-H148Q/I152L 相对荧光信号强

弱来反映氯离子通道开放情况的研究方法得到了越来越多研究小组的采用和认可^[1, 7, 14]。构建基于 YFP-H148Q/I152L 细胞模型的研究方法具有经济、简便、快速和灵敏等诸多优点。本研究结果表明，荧光信号在低渗状态下淬灭，碘离子(或氯离子)内流，证实 LRRC8A 容积调控性阴离子通道转运碘离子和氯离子；渗透压越低，离子通道开放程度越大，转运阴离子的速度越快；当细胞内外趋于等渗时，离子通道开放程度逐渐变小，最后关闭，表明渗透压是调控 LRRC8A 容积调控性阴离子通道开放的重要因素；氯离子通道抑制剂 NFA 对 LRRC8A 通道的转运具有抑制作用；LRRC8A 阴离子通道开放程度与氯离子通道抑制剂浓度有关；LRRC8A 阴离子通道开放程度与氯离子通道抑制剂加入而导致的渗透压变化无关；FRT 细胞内源性表达 LRRC8A；LRRC8A 具有经典的 VRAC 的特性；LRRC8A 是研究 VRAC 作用机制过程中不可缺少的一部分，研究 LRRC8A 与某些疾病之间的联系是目前医学、分子生物学、生理学等领域的亟待解决的问题。本研究构建了研究 LRRC8A 功能及生理特性的细胞模型，为构建阴离子通道的模型和深入研究相关生理和病理过程奠定了分子基础。

参考文献

- 1 Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia LJ, Reinhardt J, Orth AP, Patapoutian A. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 2014; 157(2): 447–458.
- 2 Syeda R, Qiu Z, Dubin AE. LRRC8 proteins form vol-

- ume-regulated anion channels that sense ionic strength. *Cell* 2016; 164(3): 499–511.
- 3 Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 2009; 89(1): 193–277.
 - 4 Pedersen SF, Okada Y, Nilius B. Biophysics and physiology of the volume-regulated anion channel (VRAC)/volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR). *Pflugers Arch* 2016; 468(3): 371–383.
 - 5 Friard J, Tauc M, Cougnon M, Compan V, Durantou C, Rubera I. Comparative effects of chloride channel inhibitors on LRRC8/VRAC-mediated chloride conductance. *Front Pharmacol* 2017; 8: 328. doi:10.3389/fphar.2017.00328.
 - 6 Jentsch TJ, Lutter D, Planells-Cases R, Ullrich F, Voss FK. VRAC: Molecular identification as LRRC8 heteromers with differential functions. *Pflugers Arch* 2016; 468(3): 385–393.
 - 7 Voss FK, Ullrich F, Münch J, Lazarow K, Lutter D, Mah N, Andrade-Navarro MA, von Kries JP, Stauber T, Jentsch TJ. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* 2014; 344(6184): 634–638.
 - 8 Gaitán-Peñas H, Pusch M, Estévez R. Expression of LRRC8/VRAC currents in *Xenopus* oocytes: advantages and caveats. *Int J Mol Sci* 2018; 19(3). pii:E719. doi: 10.3390/ijms19030719.
 - 9 Verkman AS, Jayaraman S. Fluorescent indicator methods to assay functional CFTR expression in cells. *Methods Mol Med* 2002; 70: 187–196.
 - 10 Graefe A, Stanca SE, Nietzsche S, Kubicova L, Beckert R, Biskup C, Mohr GJ. Development and critical evaluation of fluorescent chloride nanosensors. *Anal Chem* 2008; 80(17): 6526–6531.
 - 11 Zheng K (郑锴), Xu HJ, Zang YX, Hou YJ, Zhang L, Yang HO, Zhu J, Fang F, Hao F. Effect of enhanced green fluorescent protein fusion on Ano1 physiological feature. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2015; 67(6): 623–628 (in Chinese with English abstract).
 - 12 Jentsch TJ. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(5): 293–307.
 - 13 Kunzelmann K. Ion channels in regulated cell death. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(11–12): 2387–2403.
 - 14 Caputo A, Caci E, Ferrera L. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322(5901): 590–594.