

Na_v1.5通道特性研究 —— FLIPR膜电位检测试剂盒应用

简介

电压门控离子通道表达于心脏、骨骼肌、脑神经细胞的可兴奋性细胞膜上。阻断或调控这类通道可能会有治疗效应，或也许干扰到正常细胞功能。从而，可以影响电压门控离子通道的化合物成为药物研发中重要的靶标。心肌Na_v1.5通道被归类为“河豚毒素(TTX)耐受型”。¹ Na_v1.5通道药理学意义在于其是抗心律失常药激活的靶标且被局麻药如利多卡因阻断。²

状态依赖性与使用依赖性

Na_v1.5通道展现对一些化合物例如利多卡因的抑制效应具有出状态依赖性和使用依赖性。状态依赖性抑制意味着阻断剂更易结合处于某种特殊电压依赖性构象状态(例如关闭、开放、失活)的离子通道。使用依赖性抑制指的是特殊化合物在重复性刺激条件下抑制效应的蓄积，比如一串电压脉冲。串刺激脉冲可引起通道循环变化，使得电压依赖性构象状态给予了使用依赖性化合物更多蓄积效应结合到相应的结合位点。³ 状态和使用依赖性现象导致了一些化合物在膜电位实验和膜片钳数据之间IC₅₀浓度的改变。

FLIPR[®]膜电位(FMP)检测试剂盒提供快速、可靠的基于荧光方法的检测化合物调节或阻断电压门控离子通道引起的膜电位变化。早前实验已表明检测化合物与膜电位染料之间的相互作用可能引起荧光效应的变化，从而导致对化合物活性评估的改变。⁴ Molecular Devices已开发出两种不同类型的免洗FLIPR膜电位检测试剂盒：蓝色和红色。每种试剂盒采用专有的指示剂染结合不同的淬灭剂，以最大化细胞系/通道/化合物适用性以消除数据中存在的差异性。基于化合物库中不同的化学特性、化合物自发荧光的差异、或染料在细胞类型或受体上的效应，一种类型染料的效应可能明显强于另外一种。

N在方法开发阶段，可以通过使用化合物库中一种代表性的样品来检测两种试剂盒的表现，从而评估最优的化合物效应。心肌Na_v1.5通道被用来在FLIPR TETRA[®]系统上演示膜电位功能性检测试验，以展示FLIPR膜电位红色和蓝色检测试剂盒的最佳结果。

材料

- 细胞系: 电压门控钠离子通道Nav1.5 稳定表达的CHL (中国仓鼠肺细胞)
- 培养基: Dulbecco's Modified Eagle's Media (Invitrogen Cat. #11995), 5%胎牛血清(FBS, Hyclone Cat #SH30071.03), 1% 青/链霉素/谷氨酰胺 (Invitrogen Cat. #103786), 450 µg/mL Geneticin (Invitrogen Cat. #10131-035)
- 缓冲溶液: 10X HBSS (Invitrogen Cat. #1406-5056)溶于灭菌水用于加样 (Irvine Scientific Cat. 9309), 含20 mM HEPES (Invitrogen Cat. #15630-080)。调节pH至7.4。
- FLIPR膜电位检测试剂盒(Molecular Devices, 红色 Cat. #R8123, 蓝色 Cat. #R8034)
- 黑壁、底透、无菌、表面经过处理的384-孔板 (Corning Cat. #3072)
- 钠通道调节剂:
 - 藜芦定(Sigma Cat. #V-5754)
 - 利多卡因Sigma Cat. #L-7757)
 - 河豚毒素(TTX, Sigma Cat. #T-8024)
- FLIPR Tetra系统 (Molecular Devices)

优势

- 检测由调控或阻断电压门控离子通道的化合物引起的膜电位变化
- 最大化细胞系/通道/化合物的适用性以消除数据中存在的差异性

方法

实验板准备

准备 384-孔实验记录板, Nav1.5细胞用胰蛋白酶消化、在培养基中重悬并按照每孔25 μL 、12500个细胞铺在黑壁底透的384孔板中。37°C、95% 湿度和5% CO_2 条件下在培养箱中过夜培养。

FLIPR膜电位实验

步骤1: 准备10块板加载染料的缓冲液, 100mL缓冲液可以完全溶解一瓶FMP红色大包装试剂盒。

步骤2: 从培养箱中取出细胞板, 每孔中直接加入25 μL 染料加载缓冲液, 无需去除培养基或冲洗。

步骤3: 在FLIPR Tetra系统进行检测之前, 已加载染料的细胞板在室温下放置30分钟。

步骤4: 准备FLIPR Tetra系统, 采用表1中列出的参数设置。

步骤5: 在聚丙烯材料的384-孔板中, 准备量效反应的系列浓度, 包含了5X浓度的藜芦定, 电压依赖性的钠通道开放剂; 10X浓度的钠通道阻断剂利多卡因和TTX。

步骤6: 在FLIPR Tetra系统上, 加入藜芦定至Nav1.5 细胞板中开放钠通道并记录细胞膜去极化引起的荧光变化。测定出藜芦定最大效应80% (EC_{80}) 的有效浓度。

步骤7: 实验前, 加入5 μL 的10X浓度通道阻断化合物至其它的加载染料的细胞板中, 室温下孵育15分钟。

步骤8: 在FLIPR Tetra系统, 添加5X EC_{80} 浓度的藜芦定并记录细胞膜去极化时荧光信号的变化。

步骤9: 测定利多卡因和河豚毒素的 IC_{50} 。

步骤10: 用FMP蓝色试剂盒重复上述实验。

步骤11: 测定Nav1.5通道阻断剂化合物的 IC_{50} 浓度以及用Prism GraphPad软件拟合量效曲线。

Parameter	Setting
Excitation/Emission Wavelength	510 – 545/565 – 625 nm
LED Intensity	80%
Camera Gain	50
Exposure Time	0.4 sec.
Read Interval	1 sec.
Dispense Volume	12.5 μL
Dispense Height	20 μL
Dispense Speed	25 $\mu\text{L}/\text{sec}$.
Expel Volume	0.5 μL
Dispense Tip Up Speed	6 mm/sec.

表1. FLIPR Tetra系统在膜电位检测试验中的设置 (384孔)

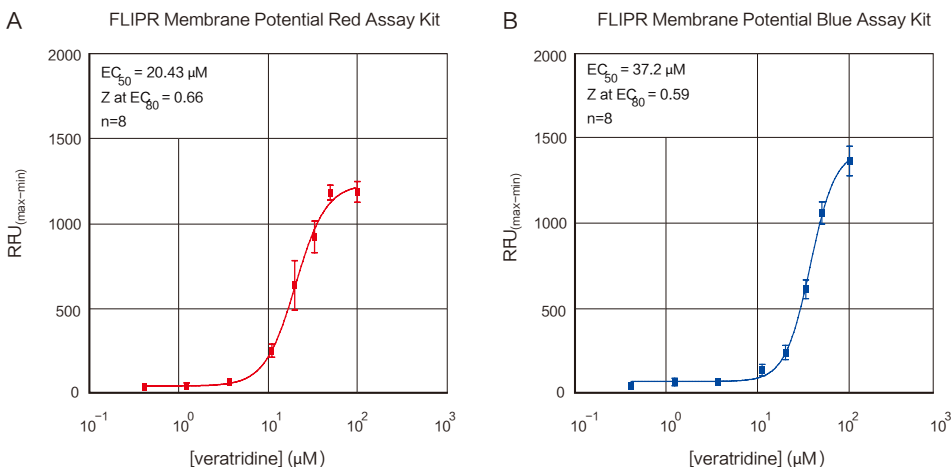


图1. 藜芦定在Nav1.5 通道上的效应。藜芦定 EC_{50} 曲线的比较 (A) FLIPR 膜电位红色试剂盒结果。(B) FLIPR 膜电位蓝色试剂盒结果显示藜芦定效应存在轻微的差异。

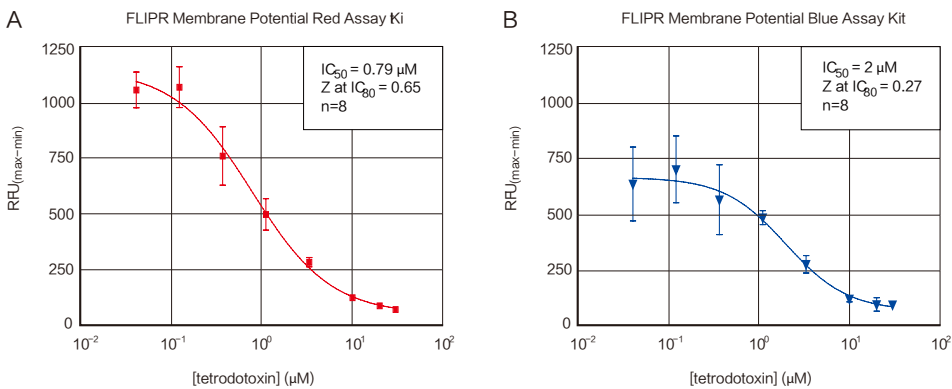


图2. TTX对CHL细胞上表达的Nav1.5 的调控。河豚毒素 IC_{50} 曲线的比较。(A) FLIPR 膜电位红色试剂盒。(B) FLIPR 膜电位蓝色试剂盒。在FMP红色试剂盒检测结果中可得到更高的Z因子值

结果

藜芦定：通道开放剂

在电生理实验中，在细胞膜上施加电压刺激以开放钠离子通道，然后快速进入失活状态。作为对比，在膜电位荧光实验中，藜芦定通过结合相应位点被用来维持钠通道开放状态以阻止其失活，这两个位点在文献中已有报道⁵，是六个跨膜螺旋中已分离出的毒性结合位点。Na⁺快速内流进入细胞引起细胞膜去极化，从而导致荧光信号增强。如图1所示，FMP红色与蓝色试剂盒检测的藜芦定细胞效应的结果是相似的。相比于FMP红色试剂盒20.4 μM的EC₅₀值，FMP蓝色试剂盒的EC₅₀值是37.2 μM，有轻微的右移。

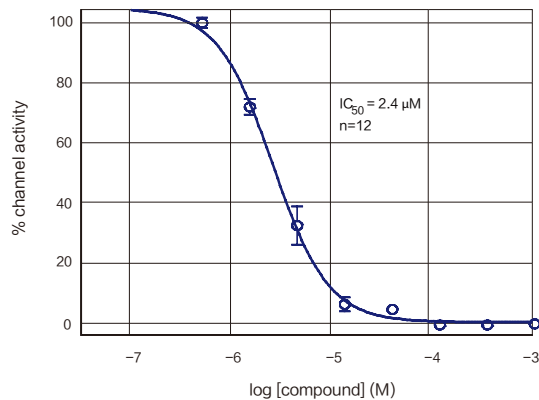


图3. 电生理实验结果的TTX量效曲线。量效曲线结果来自于Molecular Devices公司的IonWorks®系统的电生理实验数据，IC₅₀值为2.4 μM。

河豚毒素：通道阻断剂

河豚毒素是一种源自日本河豚鱼的强效的钠通道阻断剂。加入藜芦定15分钟前，10X剂量效应的梯度浓度被加入细胞中以阻断通道开放。结果显示FMP红色试剂盒IC₅₀值为0.79 μM，FMP蓝色试剂盒IC₅₀值为2 μM。FMP红色试剂盒检测过程中的荧光信号变化更强烈(图2)。另外，FMP红色试剂盒检测结果中的Z因子值⁶也比FMP蓝色试剂盒更高。TTX量效曲线结果来自于Molecular Devices公司的IonWorks®系统的电生理实验数据(图3)，IC₅₀值为2.4 μM。膜电位实验结果与已发表的传统膜片钳数据¹是一致的。

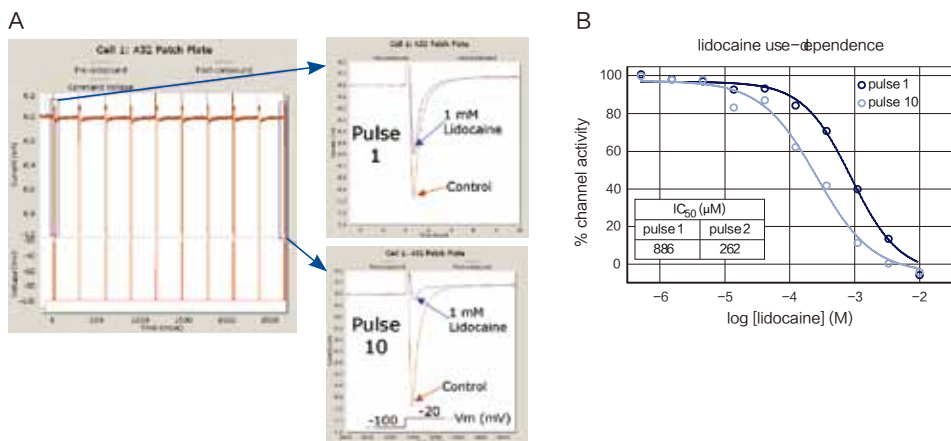


图4. 使用依赖性检测。(A) 用于检测使用依赖性的电压刺激脉冲方案(左)，共10个脉冲。脉冲1的原始Na⁺电流图(右上)和10个脉冲串刺激的电压方案。(B) 显示了利多卡因的量效曲线。脉冲1和脉冲10测得的IC₅₀值分别为886 μM和262 μM。

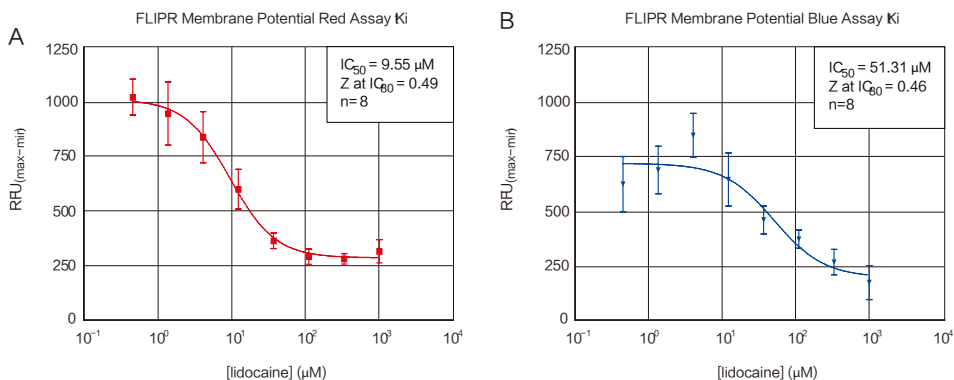


图5. 利多卡因对CHL细胞上表达的Na_v1.5的调控。利多卡因IC₅₀曲线的比较。FLIPR膜电位红色试剂盒(A)产生更强的荧光信号变化以及更敏感的利多卡因效应，相比于FLIPR膜电位蓝色试剂盒(B)。

利多卡因：使用依赖性的通道阻断剂

利多卡因是一种局麻药，其以使用依赖性的方式阻断钠离子通道。图4中展示了IonWorks电生理数据的使用依赖性特点。其中A图中比较了脉冲1和脉冲10并展示了一串电压刺激脉冲以及Na⁺原始电流。图4的B图中显示了利多卡因的量效曲线。脉冲1和脉冲10测得的IC₅₀值分别为886 μM和262 μM。这可以作为一个明显的使用依赖性的证据。因为在从脉冲1到脉冲10的一串电压刺激过程中，关闭、开放、和失活状态循环出现，从而利多卡因暴露在开放和失活状态下的时间长度逐渐增加。显示在脉冲10的量效曲线中，利多卡因的效价显著左移。

FLIPR膜电位检测试剂盒在图5中的结果显示FMP红色试剂盒的IC₅₀是955 μM以及FMP蓝色试剂盒的IC₅₀是51.3 μM。FMP红色试剂盒结果中的Z因子值也高于其它FMP蓝色试剂盒结果。本试验中得到的高效价检测结果可能是由于藜芦定锁定了通道保持在开放构象状态下，最大限度增加了通道对利多卡因和TTX的暴露，从而显著增加了两者的效价。推荐采用全自动膜片钳方法在FLIPR实验完成验证后对感兴趣的化合物进行二次筛选。

结论

作为高通量膜电位筛选策略的一部分，藜芦定用来代替电压去开放钠通道，去验证调节性化合物。通过通道阻断剂TTX和使用依赖性阻断剂利多卡因的证实，IC₅₀浓度可能产生变化，因而在FLIPR Tetra系统上被确证的感兴趣化合物需要通过全自动或传统膜片钳方法进一步验证。FLIPR膜电位检测试剂盒有两种模式可供选择，其可以针对特殊的细胞类型或化合物种类提供最优的膜电位检测结果。在本研究中，FMP红色和蓝色试剂盒在藜芦定基础上均产生了好的结果。

当加入TTX和利多卡因之类的化合物之后，FMP红色试剂盒具有更好的结果。

参考文献

1. J. Satin, J.W. Kyle, M. Chen, P. Bell, L.L. Cribbs, H.A. Fozzard, *et al.* A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science* 1992; 256:1202-1205.
2. W.A. Catterall, A.L. Goldin, S.G. Waxman. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57:397-409.
3. B. Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes, Edn. Third.* (Sinauer Associates, Sunderland; 2001).
4. C. Wolff, B. Fuks, P. Chatelain. (2003) Comparative Study of Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Probes and Their Use in Ion Channel Screening Assays. *J Biomol Screen*, 8, 533 – 543.
5. S. Cestele, R.B. Ben Khalifa, M. Pelhate, H. Rochat, D. Gordon. Alpha-scorpion toxins binding on rat brain and insect sodium channels reveal divergent allosteric modulations by brevetoxin and veratridine. *J Biol Chem* 1995; 270: 15153-15161.
6. J. Zhang, *et. al.* A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays, *J Biomol Screen* 1999, Vol. 4, (2) 60-73.



扫一扫关注我们
的官方微信