

TMEM16A 的表达下调对骨骼肌细胞分化的影响

袁 文, 范春娥, 陈宇琛, 许艳华, 张茜茜, 孙志远, 陈华群

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] TMEM16A (Transmembrane Protein 16A) 是一种钙离子 (Ca^{2+}) 激活的氯离子通道 (Calcium-activated Chloride Channels, CaCCs), 在机体内广泛表达, 具有重要的生理功能. 迄今为止, TMEM16A 在骨骼肌发育中的作用及机制尚无报道. 本研究利用 TMEM16A 特异性抑制剂 T16A_{inh}-A01 首次探讨了其表达下调对骨骼肌细胞分化的影响. 研究发现, T16A_{inh}-A01 处理显著抑制 C2C12 和原代成肌细胞的肌分化. 进一步研究发现, T16A_{inh}-A01 明显抑制肌分化过程中生肌素 Myogenin 的表达. 研究结果提示, TMEM16A 的钙激活氯通道活性可能参与了骨骼肌细胞的分化过程, 具体的作用机制有待进一步研究.

[关键词] TMEM16A, T16A_{inh}-A01, C2C12, 成肌细胞, 生肌素

[中图分类号] Q291 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2020)03-0106-06

The Effect of Down-Regulation of TMEM16A Expression on Skeletal Muscle Cell Differentiation

Yuan Wen, Fan Chun'e, Chen Yuchen, Xu Yanhua, Zhang Qianqian, Sun Zhiyuan, Chen Huaqun

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: TMEM16A (Transmembrane Protein 16A) is one of the calcium (Ca^{2+}) activated chloride channels (CaCCs). It is widely expressed in a variety of tissues and has important physiological functions. So far, the role of TMEM16A in the development of skeletal muscle has not been determined. In this study, we reported for the first time the effects down-regulation of TMEM16A on myogenic differentiation of myoblasts by using of the specific inhibitor T16A_{inh}-A01. We found that TMEM16A was apparently expressed both in myoblast cell line C2C12 and murine primary myoblast. We then determined that T16A_{inh}-A01 apparently inhibited the myogenic differentiation of both C2C12 and primary myoblasts. Furthermore, we showed that the expression of myogenin was obviously reduced in T16A_{inh}-A01 treated cells. Our results suggest that the calcium activated chloride channel activity of TMEM16A is involved in the myogenic differentiation of myoblast, the mechanisms under is still need to be investigated.

Key words: TMEM16A, T16A_{inh}-A01, C2C12, myoblast, myogenin

钙激活的氯通道 (CaCCs) 是一种普遍存在的氯离子通道. 1982 年, 钙激活的氯离子通道首次在非洲爪蟾卵母细胞与蝶螈光感受器中被检测到^[1]. 后续研究发现, CaCCs 参与了多种机体功能, 包括神经兴奋传导、嗅觉和上皮细胞的氯离子分泌等^[2]. 2008 年, 3 个独立的实验小组分别从不同的方面证实了 TMEM16A 是 CaCCs 的分子基础^[3-5]. TMEM16A 在小鼠以及人类的组织中广泛表达, 如肝脏、心脏、骨骼肌和肾脏等^[6]. 作为一种钙激活的氯通道, TMEM16A 有许多重要的细胞生物学功能^[7], 如促进细胞的增殖^[8-10]、调节平滑肌的收缩^[11]和呼吸道上皮细胞氯离子和黏液的分泌等^[7].

之前的研究报道, 小鼠骨骼肌中有 TMEM16A 的表达, 而 TMEM16A 在骨骼肌中的功能鲜有报道. 最近在斑马鱼中的研究发现其对于骨骼肌的兴奋-收缩偶联具有重要的生理作用^[12]. 本文利用 TMEM16A 特异性抑制剂 T16A_{inh}-A01 研究了其钙激活的氯通道活性对于骨骼肌分化的影响.

收稿日期: 2019-06-03.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31371356)、江苏省教育厅重大项目 (13KJA180004).

通讯作者: 陈华群, 教授, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: chenhuaqun@njnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠成肌细胞株 C2C12 购自南京沐赛生物技术有限公司,本课题组保存. C57BL/6J 小鼠购自南京大学生物医药研究院. DMEM 高糖培养基、F10 基础培养基、胎牛血清、马血清、青链霉素、胰酶、Trizol 及山羊抗小鼠 IgG(二抗)均购自 Thermofisher 公司;胶原酶 D/Dispase type II 购自 Roche 公司;CaCl₂、PVDF 膜、DMSO 购自 Sigma 公司;逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司;bFGF 细胞生长因子购自 R&D system 公司;鼠尾胶原 Collagen type I 购自美国康宁公司;兔抗 TMEM16A 多克隆抗体购自 Abcam 公司;鼠抗 MF20 多克隆抗体、鼠抗 Myogenin 多克隆抗体购自 DSHB;鼠抗 GAPDH 多克隆抗体购自南京巴傲德生物科技有限公司;兔抗 Desmin 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;山羊血清购自武汉博士德生物有限公司;T16Ainh-A01 购自英国 Tocris 公司;化学发光试剂 ECL 购自 Bio-Rad 公司.

1.2 细胞培养

参照文献[13-14]及本实验室方法优化,分离 3 d~4 d 龄小鼠后肢肌肉,无菌的 PBS 清洗,剪碎后加入酶混合液(胶原酶 D/分散酶/CaCl₂),37 °C 消化 20 min. 消化混合物中加入 DMEM 培养基并充分吹打,200 目筛网过滤,1 000 rpm 离心 5 min,细胞沉淀用含 10% FBS、1%双抗的 DMEM 培养基贴壁培养 1 h 去除成纤维细胞,缓慢摇晃培养皿收集未贴壁细胞,再 1 000 rpm 离心 5 min,细胞沉淀用 F10 完全培养基(含 20% FBS、1% 双抗和 5 ng/mL bFGF)悬浮后接种于提前用鼠尾胶原铺板的 24 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养. 约第 3 d 时细胞密度达到 70%~80%,进行传代. 本方法分离培养的原代成肌细胞经过 Desmin 染色鉴定纯度在 90%以上(未发表结果). C2C12 细胞用含 10% FBS 及 1%双抗的高糖 DMEM 培养基培养.

1.3 肌分化诱导

接种细胞,一般 24 h 后细胞密度达到约 80%~90%时,加入分化培养基(Differentiation Medium, DM)(含 2%马血清和 1%双抗的 DMEM)诱导分化. 本文用第 2~3 代新鲜分离培养的成肌细胞作为原代细胞进行肌分化诱导.

1.4 Western blot 检测相关蛋白质表达水平

收集培养的 C2C12 以及原代成肌细胞,RIPA 裂解液提取细胞总蛋白. 提取的蛋白以 10% SDS-PAGE 进行凝胶电泳,将蛋白条带转移至 PVDF 膜. 膜以 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗 4 °C 过夜. 二抗在室温下孵育 1 h,化学发光试剂 ECL 显色,以 Tanon-5200 扫膜仪进行信号检测.

1.5 荧光实时定量 PCR 分析 mRNA 表达水平

按照说明书以 Trizol 试剂提取总 RNA 并测定浓度,将 mRNA 反转录为 cDNA,在 StepOnePlus™ Real-Time PCR System 仪器进行 PCR 反应分析细胞 mRNA 水平. 引物序列如下: *Tmem16a* 上游:5'-GTG CCA CTG TGG ACG AAA AC-3',下游:5'-CAA AAA GGT GAC TGG CAC GG-3'; *Gapdh* 上游:5'-GGT TGT CTC CTG CGA CTT CA-3',下游:5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3'. 反应程序为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环.

1.6 免疫荧光

肌分化后,弃培养基,PBS 清洗,4% PFA 室温固定 15 min,0.5% Triton X-100 透化 15 min,然后用山羊血清 NGS 室温下封闭 1 h,4 °C 一抗孵育过夜,二抗室温孵育 1 h. 细胞核用 DAPI 复染,加入防淬灭剂,激光扫描共聚焦显微镜(Nikon Ti-E-A1R)拍照,Photoshop 作图.

1.7 T16Ainh-A01 抑制剂处理

T16A_{inh}-A01 以 DMSO 溶解制备 100 mmol/L 储存液,置于-20 °C 保存. 用前以培养基稀释,DMSO 作为对照.

1.8 统计分析

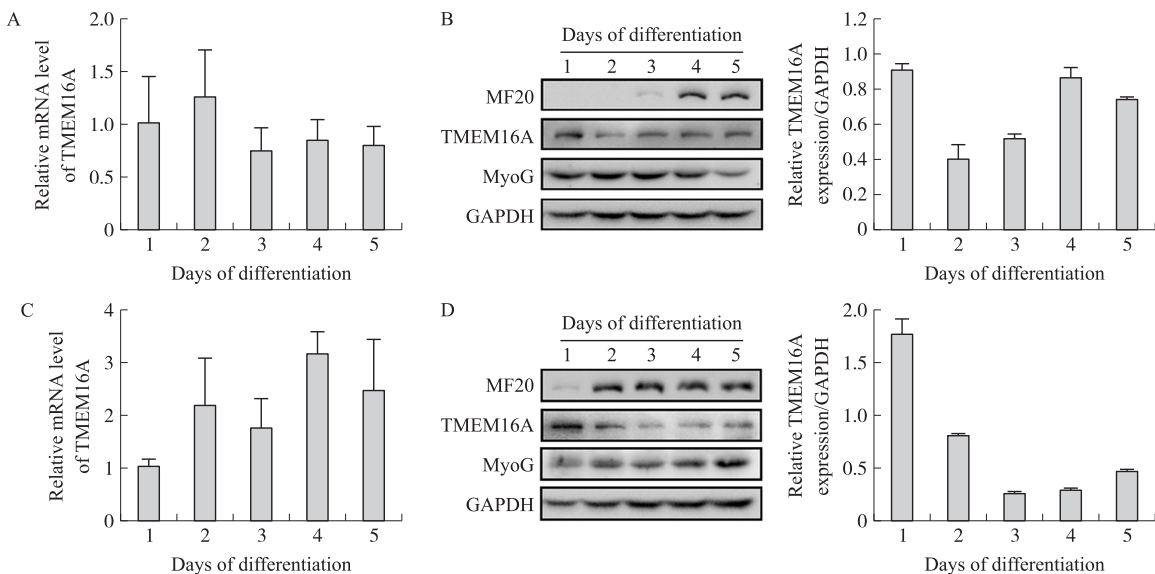
使用 Origin 8.0 分析数据,并将所有实验结果表示为(平均值±标准误)(s.e.m.),实验重复 3 次. 组间统计学显著性通过双尾 *t* 检验进行. 其中 $P<0.05$ 说明两个样本间有显著差异,表示为 *; $P<0.01$ 说明有很显著差异,表示为 **; $P<0.001$ 说明有极其显著差异,表示为 ***.

2 结果与讨论

2.1 TMEM16A 在 C2C12 和原代成肌细胞分化过程中的表达

C2C12 是体外肌分化研究常用的细胞模型^[15]. 在含 10% FBS 的 DMEM 培养基(Growth Medium, GM)中培养,细胞处于增殖状态;而在含 2% 马血清的 DMEM(Differentiation Medium, DM)中诱导肌分化. 研究发现,在两种细胞中存在 TMEM16A 较高水平的表达(结果未显示). 在分化第 1 d 至第 5 d,荧光定量 PCR 结果显示,肌分化过程中存在 TMEM16A 的 mRNA 水平的表达(图 1A),与 mRNA 水平表达不同, TMEM16A 蛋白水平表达在第 1 d 表达水平较高,随着分化天数的增加其表达降低后升高(图 1B). 同时, TMEM16A 的表达量与生肌素 Myogenin 和肌细胞特异结构蛋白肌球蛋白重链(抗体为 MF20)的表达量之间没有明显相关性.

新生小鼠的肌肉中存在类似于 C2C12 的原代成肌细胞(myoblast),又称作肌肉前体细胞或原代肌母细胞,在出生后的发育过程中继续增殖分化为肌纤维,形成骨骼肌^[16]. 通过对新鲜分离的小鼠原代成肌细胞的研究发现,肌分化过程中也存在 TMEM16A 的 mRNA 水平的表达(图 1C),而蛋白水平显示, TMEM16A 在分化第 1 d 表达水平较高,之后有所降低(图 1D). 肌分化过程中原代小鼠成肌细胞中 TMEM16A 的表达特征与 C2C12 细胞的分化过程相似. 以上结果表明,肌分化过程中存在 TMEM16A 的 mRNA 和蛋白水平表达,提示其可能参与肌分化过程的调节.



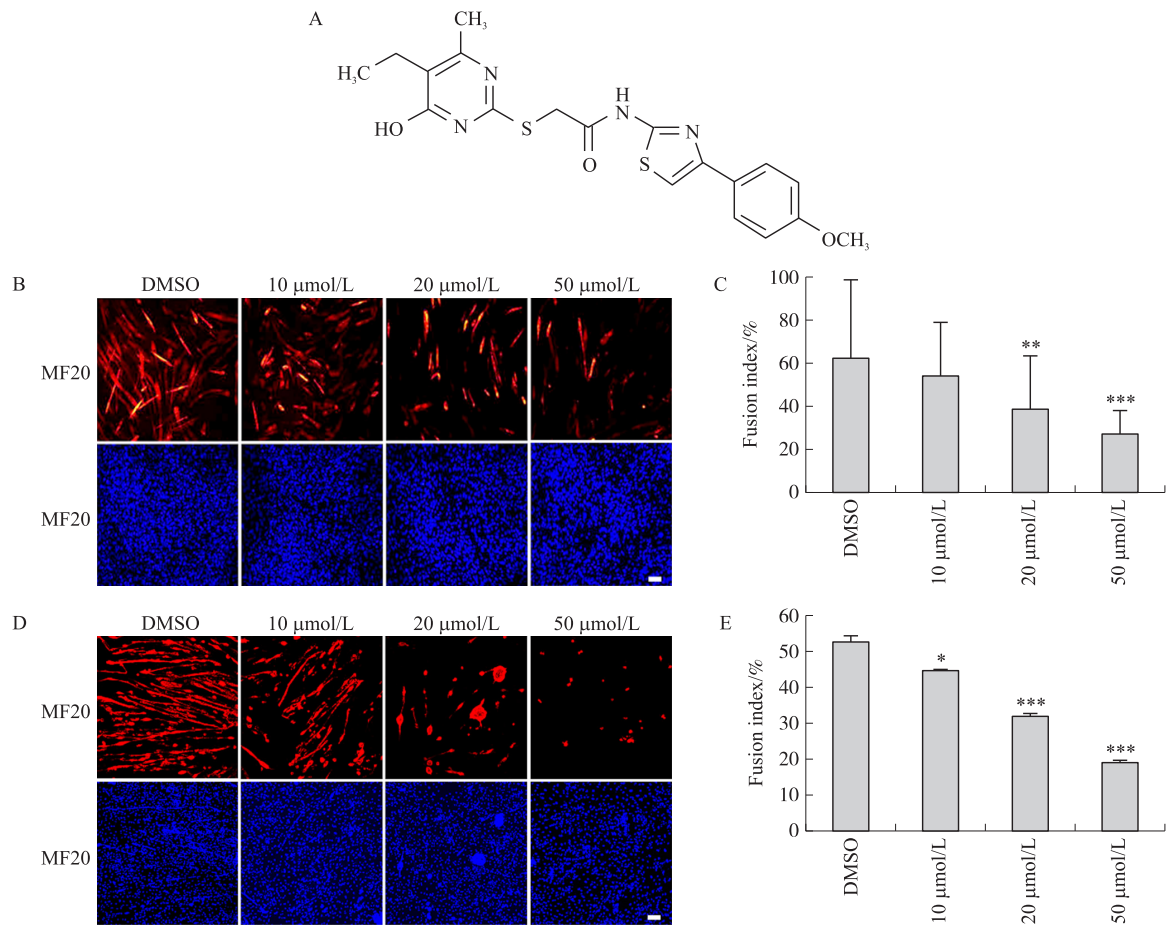
A, C: 荧光定量 PCR 分析 C2C12 (A) 和原代成肌细胞 (C) 分化过程中 TMEM16A mRNA 的表达,以 Gapdh 为内参,重复实验为 3 次. B, D: Western blotting 分析 C2C12 (B) 和小鼠原代成肌细胞 (D) 分化过程中 TMEM16A 蛋白质水平的表达,以及蛋白水平灰度分析,重复实验 3 次.

图 1 C2C12 和原代成肌细胞分化过程中 TMEM16A 的表达

Fig. 1 Expression of TMEM16A during C2C12 and myoblast differentiation

2.2 T16A_{inh}-A01 对肌分化的影响

T16A_{inh}-A01 (2-[(5-Ethyl-1, 6-dihydro-4-methyl-6-oxo-2-pyrimidinyl) thio] -N-[4-(4-methoxyphenyl) -2-thiazolyl] -acetamide, 中文名氨基苯基噻唑) 是一种 TMEM16A 的特异性抑制剂(图 2A),可以抑制钙离子激活的氯通道活性^[17]. 在诱导肌分化时,分化培养基中加入 T16A_{inh}-A01,观察肌管的形成,并利用 MF20 染色肌球蛋白重链显示分化第 4 d 的肌管. 结果发现,与 DMSO 对照相比,在浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, T16A_{inh}-A01 对于 C2C12 和原代成肌细胞的肌分化都有抑制作用,表现为肌管的形态变小和变短(图 2B、2D),肌分化指数降低(图 2C、2E),其中浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制作用最为显著. 以上结果提示, C2C12 及原代成肌细胞的肌分化过程需要钙离子激活的氯通道活性.



A: T16A_{inh}-A01 的化学结构式; B、D: 免疫荧光观察不同浓度 T16A_{inh}-A01 处理分化的 C2C12 以及原代成肌细胞, 红色为 MF20 代表肌管, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核。标尺: 100 μm; C、E: B 图和 D 图中肌分化指数 (肌管中核的数目占总核数目的百分比) 的统计, 重复实验为 3 次。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 不同浓度的 T16A_{inh}-A01 对 C2C12 和原代成肌细胞分化的影响

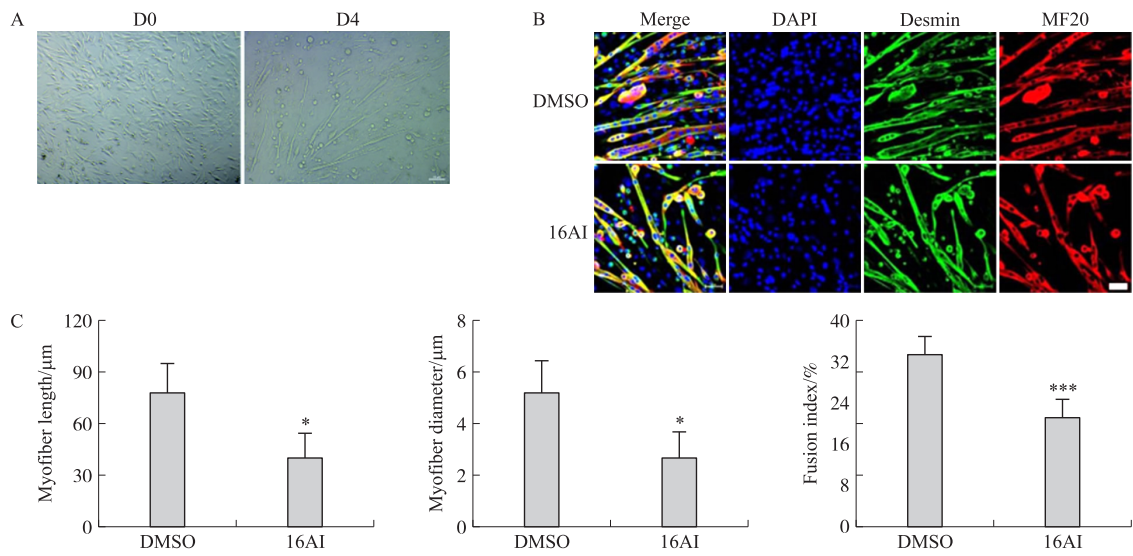
Fig. 2 Effects of different concentrations of T16A_{inh}-A01 on C2C12 and myoblast differentiation

2.3 TMEM16A 表达下调抑制原代成肌细胞肌管的形成

由于原代成肌细胞更贴近体内的环境, 因此本文着重研究了 TMEM16A 表达下调对原代成肌细胞分化的影响。首先, 对正常培养的原代成肌细胞以及分化 4 d 后肌管的形态进行了白光拍照 (图 3A), 证明了原代成肌细胞可以正常分化。在 2.2 中, 验证了 20 μmol/L 以及 50 μmol/L 浓度的抑制剂对原代成肌细胞分化的影响显著, 因此在分化培养基中加入 20 μmol/L 的 T16A_{inh}-A01, 并在分化第 4 d 时, 收取细胞, 固定, 进行免疫荧光染色, 并在 40 倍的激光共聚焦显微镜下拍照, Desmin 染色验证了分离的原代成肌细胞的有效性, MF20 染色肌球蛋白重链 (图 3B)。并对肌管的长度、直径以及融合指数进行统计分析, 结果显示, 20 μmol/L 的 T16A_{inh}-A01 处理后即 TMEM16A 表达下调后, 原代成肌细胞分化受到影响, 表现为肌管的长度变短, 直径减小, 融合指数下降 (图 3C)。

2.4 T16A_{inh}-A01 抑制 C2C12 和原代成肌细胞分化中 MyoG 的表达

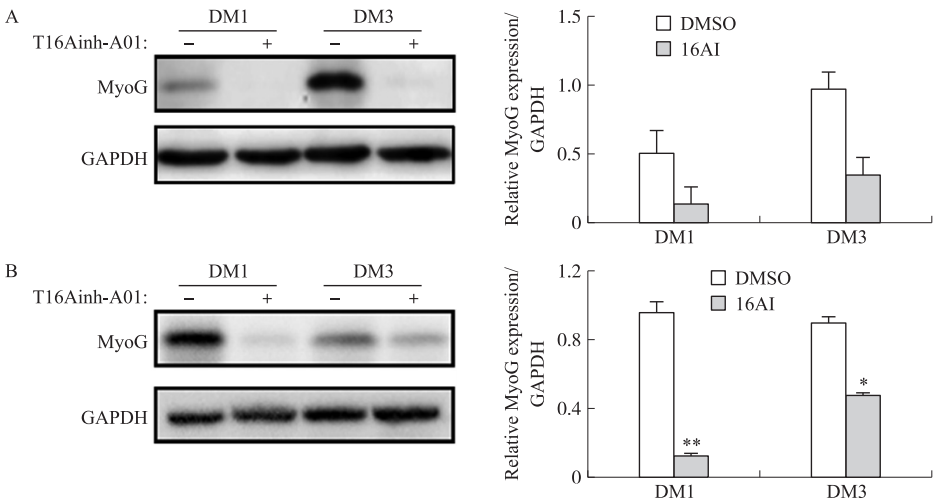
肌分化主要受 MRF (Myogenic Regulatory Factors) 家族成员的调节^[18], 生肌素 Myogenin (MyoG) 属于 MRF 家族成员, 是肌肉特异性碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 转录因子, 参与骨骼肌发育或肌细胞生成和修复的协调, 调节终末肌分化过程^[19]。在前面 2.2 中用不同浓度的 T16A_{inh}-A01 处理 C2C12 和原代成肌细胞时, 20 μmol/L 以及 50 μmol/L 浓度的抑制剂对分化的影响显著, 因此选取 20 μmol/L 进行下面的研究。在分化培养基中加入 20 μmol/L 的 T16A_{inh}-A01, 在 DM1 (分化第 1 d) 和 DM3 (分化第 3 d) 时提取蛋白进行 Western blot 分析。结果发现, MyoG 蛋白表达水平均显著低于对照组 (图 4)。



A: 原代成肌细胞以及肌管(分化 4 d)的形态白光拍照. 标尺: 100 μm ; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 T16A_{inh}-A01 处理分化的原代成肌细胞, 蓝色为 DAPI 染色, 绿色为 Desmin 即结蛋白染色, 红色为 MF20 代表肌管. 标尺: 20 μm ; C: 对 B 图的肌管的长度、直径以及融合指数的统计分析. 重复实验为 3 次. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图 3 TMEM16A 表达下调抑制原代成肌细胞肌管的形成

Fig. 3 Down-regulation of TMEM16A expression inhibits myotube formation in primary myoblast



A: Western blot 检测 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 T16A_{inh}-A01 处理后 C2C12 分化第 1 d、3 d 的 MyoG 蛋白质水平, 及其蛋白水平灰度扫描结果 ($n = 3$); B: Western blot 检测 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 16A_{inh}-A01 处理后原代成肌细胞分化第 1 d、3 d 的 MyoG 蛋白质水平, 及其蛋白水平灰度扫描结果 ($n = 3$). 重复实验为 3 次, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图 4 T16A_{inh}-A01 抑制 C2C12 和原代成肌细胞分化中 MyoG 表达

Fig. 4 T16A_{inh}-A01 inhibits MyoG expression during C2C12 and myoblast differentiation

3 结论

目前的研究发现, TMEM16A 的功能多是作为一种钙激活的氯离子通道, 定位于细胞膜. 细胞中钙离子浓度的升高导致其通道活性激活, 引发氯离子的内流或外流. 之后报道了多种针对氯离子通道或电流的抑制剂, 如 NFA (Niflumic Acid)、DIDS (4, 4-diisothiocyanatostilbene-2, 2-disulfonic Acid)、NPPB (5-nitro-(3-phenylpropylamino)-benzoic Acid)、FFA (Flufenamic Acid)^[20], 这些抑制剂均在广谱上抑制氯离子通道的表达或是氯电流的释放^[21], 但其中一些也可以阻断其他通道, 如 NFA 和 DIDS 可以在某些细胞中阻断容量调节离子通道 (VRAC); NFA 和 FFA 还会激活钙依赖的钾离子通道^[22]; NPPB 在非洲爪蟾卵母细胞中则可以阻断内源性钾电流等^[23]. 而 T16A_{inh}-A01 是针对 TMEM16A 的一种特异性高效抑制剂, 通过逆转膜的去极化以及抑制 VDCC (电压依赖型钙通道) 特异性地抑制 TMEM16A^[24], 被发现在平滑肌与血管中

强有力地降低全细胞电流,并在膜片钳中被用作阻断电流的抑制剂^[21]. T16A_{inh}-A01 在 10 μ mol/L 浓度时,可有效抑制钙离子升高引发的氯电流^[25]. TMEM16A 在一些原发或继发性肿瘤组织包括食管癌、乳腺癌、膀胱癌及头颈部鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤中高表达,促进肿瘤细胞的增殖及迁移,被认为是抗肿瘤候选药物靶点. 本文首先发现,在 C2C12 细胞及原代成肌细胞中均有较丰富的 TMEM16A 蛋白表达,在诱导肌分化后该蛋白表达水平下降;在分化培养基中加入 T16A_{inh}-A01 以抑制其活性明显抑制肌分化,表现为肌分化指数降低,肌管变小变细,生肌素和骨骼肌特征结构蛋白肌球蛋白重链的蛋白表达水平降低. 提示 T16A_{inh}-A01 可能是通过抑制 Myogenin 的表达抑制肌分化.

目前已经发现的 TMEM16A 细胞生物学功能主要包括呼吸道上皮细胞黏液的分泌、听力的传导、卵细胞受精的调控以及细胞的增殖等. 对于肿瘤细胞, TMEM16A 主要是通过激活表皮生长因子受体(EGFR)和钙调素依赖的蛋白激酶 II (CAMK II),而后是 AKT 和 MAPK 的激活,从而促进细胞的增殖^[26]. 抑制 TMEM16A 的表达则抑制细胞的增殖,甚至导致凋亡^[27-28]. 骨骼肌的分化涉及多个步骤,本文发现抑制 TMEM16A 的活性可抑制 Myogenin 的表达,其在这一过程中的具体机制还不清楚. TMEM16A 是一种钙激活的氯离子通道,氯离子外流可促进细胞膜去极化,而内流与细胞膜的超极化有关. 细胞膜的极化状态与细胞的增殖和分化密切相关,本文的研究结果提示骨骼肌的分化过程需要 TMEM16A 的钙离子激活氯通道活性,其可能通过细胞膜的极化状态调节细胞内氯离子的外流及细胞膜的去极化调节骨骼肌细胞的肌分化,具体的作用机制尚需进一步研究.

[参考文献]

- [1] HARTZELL C, ARREOLA J. Calcium-activated chloride channels[J]. Annual review of physiology, 2005, 67(1): 719-758.
- [2] TWYFFELS L, STRICKAERT A, VIRREIRA M, et al. Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte[J]. American journal of physiology cell physiology, 2014, 307(12): 1102-1112.
- [3] ANTONELLA C, EMANUELA C, LORETTA F, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity[J]. Science, 2008, 322(5901): 590-594.
- [4] SCHROEDER B C, CHENG T, JAN Y N, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit[J]. Cell, 2008, 134(6): 1019-1029.
- [5] YOUNG D Y, HAWON C, JAE Y K, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance[J]. Nature, 2008, 455(7217): 1210-125.
- [6] KUNZELMANN K, KONGSUPHOL P, ALDEHNI F, et al. Bestrophin and TMEM16—Ca activated Cl channels with different functions[J]. Cell calcium, 2009, 46(4): 233-241.
- [7] OH U, JUNG J. Cellular functions of TMEM16/anoctamin[J]. Pflügers archiv-European journal of physiology, 2016, 468(3): 1-11.
- [8] MAZZONE A, EISENMAN S T, STREGE P R, et al. Inhibition of cell proliferation by a selective inhibitor of the Ca²⁺-activated Cl-channel, Ano1[J]. Biochemical & biophysical research communications, 2012, 427(2): 248-253.
- [9] STANICH J E, GIBBONS S J, EISENMAN S T, et al. Ano1 as a regulator of proliferation[J]. American journal of physiology gastrointestinal & liver physiology, 2011, 301(6): G1044.
- [10] UMAMAHESWAR D, SHIWARSKI D J, DONG X, et al. TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression[J]. Cancer research, 2012, 72(13): 3270-3781.
- [11] BORIS M, AISTE T, PAOLO T. TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. Journal of physiology, 2010, 588(13): 2305-2314.
- [12] DAYAL A, NG S F J, GRABNER M. Ca²⁺-activated Cl-channel TMEM16A/ANO1 identified in zebrafish skeletal muscle is crucial for action potential acceleration[J]. Nature communications, 2019, 10(1): 1-15.
- [13] RANDO A T. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy[J]. Journal of cell biology, 1994, 125(6): 1275-1287.
- [14] 熊雷, 何衍佶, 戴威, 等. 小鼠原代成肌细胞分离、纯化及培养[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(3): 23-25.
- [15] ARTAZA J N, BHASIN S, MALLIDIS C, et al. Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells[J]. Journal of cellular physiology, 2002, 190(2): 170-179.
- [16] CHAL J, POURQUI O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*[J]. Development, 2017, 144(12): 2104.
- [17] WAN N, PUAY W, VERKMAN A S. TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells[J]. Journal of biological chemistry, 2011, 286(3): 2365-2374.

(下转第 135 页)

- [13] 孙骏威,赵进,周荣鑫. 不同植物生长调节剂对多花黄精组织培养的效果[J]. 贵州农业科学,2017,45(3):97-100.
- [14] 万学锋,陈菁瑛. 多花黄精组培快繁技术初探[J]. 中国现代中药,2013,15(10):850-852.
- [15] 王勇刚. ‘紫芙蓉’玫瑰组培快繁技术研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012.
- [16] 李魁鹏,王亚珍,孙晓梅,等. 杂种落叶松嫩枝离体培养与芽增殖研究[J]. 林业科学研究,2013,26(S1):82-86.
- [17] 唐佳佳,尚旭岚,洪香香. 黑荆树愈伤组织诱导、增殖与分化[J]. 中南林业科技大学学报,2014,34(9):38-43.
- [18] 周新华,厉月桥,王丽云,等. 多花黄精根茎芽高效组培增殖和生根体系研究[J]. 经济林研究,2016,34(1):51-56.
- [19] 牟小翎,张利民,杨圣祥,等. 泰山野生黄精的组培快繁技术研究[J]. 山东农业科学,2010(1):12-13.
- [20] 陈贝贝,汪安乐,蒋明,等. 黄精叶钩吻组培中褐化控制的探讨[J]. 浙江农业科学,2012,1(4):490-492.
- [21] 李莺,罗明志,罗雯,等. 黄精的组织培养与植株再生[J]. 西北农业学报,2011,20(8):159-162.
- [22] 新华,厉月桥,王丽云,等. 多花黄精根茎芽高效组培增殖和生根体系研究[J]. 经济林研究,2016,34(1):51-56.
- [23] 刘芳源. 多花黄精种质资源利用及苗体皂昔成分提取[D]. 合肥:安徽大学,2017.
- [24] 万莹. 来安花红茎段组织培养研究[D]. 南京:南京林业大学,2014.
- [25] 饶宝蓉,谢东奇,陈泳和,等. 多花黄精实生苗组培快繁技术研究[J]. 江西农业学报,2018,30(2):46-49.
- [26] 张智慧,马聪吉,王丽,等. 滇黄精组织培养及快繁技术研究[J]. 时珍国医国药,2018,29(10):2525-2527.
- [27] 许丽萍,唐红燕,贾平,等. 滇黄精根茎芽组织培养技术研究[J]. 南方林业科学,2018,1(1):33-37.
- [28] 刘静. 白鹤芋花序体细胞胚胎发生及快繁技术研究[D]. 银川:宁夏大学,2015.
- [29] 何艳,朱玉球,肖波,等. 多花黄精组织培养体系的研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(10):2032-2037.
- [30] 莫勇生,卢拓方,邱展鸿,等. 多花黄精组培苗快速繁殖体系建立研究[J]. 中国现代中药,2018,20(4):445-449.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 111 页)

- [18] MONCAUT N, RIGBY P W, CARVAJAL J J. Dial M(RF) for myogenesis[J]. Febs journal, 2013, 280(17):3980-3990.
- [19] NABESHIMA Y, HANAOKA K, HAYASAKA M, et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect[J]. Nature, 1993, 364(6437):532-535.
- [20] WHITE M M, AYLWIN M. Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^{-} -channels in *Xenopus* oocytes[J]. Molecular pharmacology, 1990, 37(5):720-724.
- [21] SAYO M, SATOMI N, KATSUHIKO M, et al. Downregulation of Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel TMEM16A by the inhibition of histone deacetylase in TMEM16A-expressing cancer cells[J]. Journal of pharmacology & experimental therapeutics, 2014, 351(3):510-518.
- [22] OTTOLIA M, TORO L. Potentiation of large conductance K Ca channels by niflumic, flufenamic, and mefenamic acids[J]. Biophysical journal, 1994, 67(6):2272-2279.
- [23] OH S J, HWANG S J, JUNG J, et al. MONNA, a potent and selective blocker for transmembrane protein with unknown function 16/anoctamin-1[J]. Molecular pharmacology, 2013, 84(5):726-735.
- [24] BOEDTKJER D M B, KIM S, JENSEN A B, et al. New selective inhibitors of calcium-activated chloride channels-T16A(inh)-A01, CaCC(inh)-A01 and MONNA—what do they inhibit? [J]. British journal of pharmacology, 2015, 172(16):4158-4172.
- [25] DAVIS A J, SHI J, PRITCHARD H A, et al. Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16A(inh)-A01[J]. British journal of pharmacol, 2013, 168(3):773-784.
- [26] ADRIAN B, ANKE B, HEIKE B, et al. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2013, 110(11):E1026-E1034.
- [27] SONG Y, GAO J, GUAN L, et al. Inhibition of ANO1/TMEM16A induces apoptosis in human prostate carcinoma cells by activating TNF- α signaling[J]. Cell death & disease, 2018, 9(6):703.
- [28] WEN L, MIN L, BAO G L, et al. Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma[J]. Cancer letters, 2012, 326(1):41-51.

[责任编辑:黄 敏]