

论著 · 临床研究

新生儿惊厥相关基因 *KCNQ2* 定点突变及其蛋白表达的研究

周熙惠 惠智艳 史瑞明 宋红霞 张葳 刘俐

(西安交通大学医学院第一附属医院新生儿科/环境与疾病相关基因教育部重点实验室
离子通道研究病室,陕西 西安 710061)

【摘要】 目的 在收集的1个良性家族性婴儿惊厥家系中发现 *KCNQ2* 基因 c. 812G > T(p. G271V) 突变, 探讨 c. 812G > T 突变体及其真核表达载体的构建方法, 并观察其在人胚肾 (HEK) 293 细胞中的表达。方法 利用重叠延伸 PCR 和限制性内切酶法构建 *KCNQ2* 基因 c. 812G > T 突变体真核表达载体 pcDNA3.0-c. 812G > T-*KCNQ2*, 用脂质体转染法将 *KCNQ2* 质粒 (野生型 pcDNA3.0-*KCNQ2* 或突变型 pcDNA3.0-c. 812G > T-*KCNQ2*) 与荧光真核表达载体 pRK5-GFP 共转染 HEK293 细胞, 激光共聚焦显微镜下观察 HEK293 细胞, 免疫荧光化学法检测蛋白质表达。结果 构建的突变体经 DNA 直接测序示 *KCNQ2* 基因 cDNA 第812位碱基 G 变为 T, 突变体在 HEK293 细胞中成功表达, 野生型和突变型基因的蛋白质都在细胞膜上表达, 提示 *KCNQ2* 钾通道孔区的突变 c. 812G > T 并不影响蛋白的正常表达。结论 成功构建 *KCNQ2* 突变基因真核表达载体, 并在 HEK293 细胞中表达 *KCNQ2* 蛋白, 为突变型 *KCNQ2* 基因的功能研究及癫痫的分子发病机制研究奠定基础。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(8): 611-616]

【关键词】 *KCNQ2* 基因; 定点突变; 真核表达载体
【中图分类号】 R722.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2011)08-0611-06

Site-directed mutagenesis and protein expression of *KCNQ2* gene associated with neonatal convulsions

ZHOU Xi-Hui, HUI Zhi-Yan, SHI Rui-Ming, SONG Hong-Xia, ZHANG Wei, LIU Li. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Email: zhouxih@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the protocol of construction of a *KCNQ2*-c. 812G > T mutant and its eukaryotic expression vector, the c. 812G > T (p. G271V) mutation which was detected in a Chinese pedigree of benign familial infantile convulsions, and to examine the expression of mutant protein in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. **Methods** A *KCNQ2* mutation c. 812G > T was engineered on *KCNQ2* cDNAs cloned into pcDNA3.0 by sequence overlap extension PCR and restriction enzymes. HEK293 cells were co-transfected with pRK5-GFP and *KCNQ2* plasmid (the wild type or mutant) using lipofectamine and then subjected to confocal microscopy. The transfected cells were immunostained to visualize the intracellular expression of the mutant molecules. **Results** Direct sequence analysis revealed a G to T transition at position 812. The c. 812G > T mutation was correctly combined to eukaryotic expressive vector pcDNA3.0 and expressed in HEK293 cells. Immunostaining of transfected cells showed the expression of both the wild type and mutant molecules on the plasma membrane, which suggested that the c. 812G > T mutation at the pore forming region of *KCNQ2* channel did not impair normal protein expression in HEK293 cells. **Conclusions** Successful construction of mutant *KCNQ2* eukaryotic expression vector and expression of *KCNQ2* protein in HEK293 cells provide a basis for further study on the functional effects of convulsion-causing *KCNQ2* mutations and for understanding the molecular pathogenesis of epilepsy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(8): 611-616]

Key words: *KCNQ2* gene; Site-directed mutagenesis; Eukaryotic expression vector

近年来,癫痫的致病基因研究取得了重大进展,自1998年 *Science* 上报道了钾通道基因 *KCNQ2* 突变与新生儿惊厥有密切关系以来, *KCNQ* 钾通道与癫痫的关系已成为研究热点,多种类型的 *KCNQ* 钾通道开放剂作为新型抗癫痫药物正在研制开发中。Tang 等^[1] 于2003年在国内首次对1个良性家族性

[收稿日期] 2010-12-19; [修回日期] 2011-02-13
[基金项目] 陕西省科学技术攻关项目 (2007K14-05)。
[作者简介] 周熙惠,女,博士,副主任医师。

新生儿惊厥 (benign familial neonatal convulsions, BFNC)家系进行了 *KCNQ2* 基因突变分析,发现了 *KCNQ2* 新突变 1931delG。本研究在 1 个良性家族性婴儿惊厥 (benign familial infantile convulsions, BFIC)家系中发现 *KCNQ2* 基因一个新的错义突变 c.812G>T,导致患儿的 *KCNQ2* 钾通道第 271 位甘氨酸被缬氨酸替换(p. G271V),该家系 4 代 62 人中有 17 名患者^[2]。由于不同的 *KCNQ2* 突变体通过不同的途径干扰钾离子通道的功能,不同的突变体引起的疾病表型也存在差异,因此探讨突变基因功能及突变对表型的影响极其重要,同时也是个体化治疗的前提^[3]。研究突变体功能的方法之一是构建突变基因真核表达载体,建立突变基因表达的细胞模型,并应用细胞模型进行药物研究。目前 *KCNQ2/KCNQ3* 在爪蟾卵母细胞 (*Xenopus oocyte*) 和人胚肾细胞 (human embryo kidney, HEK) 进行离子通道表达的实验已较为成熟^[4]。本研究以 *KCNQ2* 突变 c.812G>T 为研究对象,利用重叠延伸 PCR 技术引入突变点,并进一步构建突变 *KCNQ2* 真核表达载体在 HEK293 细胞中表达,为新生儿/婴儿惊厥相关基因功能研究建立了细胞模型,并为进一步的药物研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含有正常人全长 *KCNQ2*-cDNA 片段的真核细胞表达质粒 pcDNA3.0-KCNQ2 为河北省医科大学药理学研究室提供。载体绿色荧光蛋白 pRK5 (green fluorescent protein pRK5, pRK5-GFP)、HEK293 细胞、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司);T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶及感受态细菌 XL1-Blue (invitrogen 公司产品);胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒 (MBI 公司);脂质体转染试剂 Superfect (Qiagen 公司);DMEM 培养基 (Gibco 公司);一抗羊抗人 *KCNQ2*-N 末端单克隆抗体、二抗兔抗羊 IgM-FITC (美国 Pierce 公司)。引物合成及测序由北京奥克公司提供。PTC-200DNA 扩增仪为美国 MJ 公司产品,2000 型凝胶成像系统为美国伯乐公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据正常 *KCNQ2*-cDNA 序列设计两对引物,P1 和 P2,P3 和 P4。其中 P1 引入 EcoRI 限制性酶切位点;P2 和 P3 携带 812 位点突变 (G812T),两者有 20 bp 序列互补;P4 引入 HindIII 限

制性酶切位点。

两对引物分别为:P1: CAGAATTCCTGCAGC-CACTCATCCCCGCTGAGCCTGAG (38mer) (内含 EcoRI 限制性酶切位点);P2: TGATCAGGACCCAC-CAGAGTGCATC (25mer) (引入突变点);P3: ACTCTGGTGGGTCCTGATCAGCTGACCACCATTG (35mer) (引入突变点);P4: CTTAAGCTTTGTA-AAAGGTCAGTCCCAG (28mer) (内含 HindIII 限制性酶切位点)。引物由北京奥科生物制品公司合成,用去离子水配制成 100 pmol/ μ L。

1.2.2 PCR 反应 进行 3 步 PCR 反应。首先进行下列 2 个反应,反应体系为 50 μ L,依次加入 ddH₂O 37 μ L,10 $\times$ Pfu Polymerase Buffer (with Mg²⁺) 5 μ L,dNTP 4 μ L,引物 P1 和 P2 各 1 μ L,Pfu DNA Polymerase 1 μ L (2.5 U),*KCNQ2*-cDNA 模板 1 μ L (约 100 ng)。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。引物 P3 和 P4 采用相同的反应体系。扩增产物 P12 和 P34 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,用胶回收试剂盒回收后继续进行下列反应,以纯化产物 P12 和 P34 为模板,以 P1、P4 为引物,使用 TaKaRa 公司 PCR 酶 TaKaRa LA Taq,目的是将片段 P12 和 P34 连接成 P1234。反应体系为 50 μ L,依次加入 ddH₂O 11 μ L,2 $\times$ GC Buffer (with Mg²⁺) 5 μ L,dNTP 8 μ L,引物 P1 和 P4 各 1 μ L,胶回收的 P12 和 P34 各 1 μ L,TaKaRa LA Taq 酶 1 μ L。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 90 s,65 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3.5 min,30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,有特异目的带 P1234。

1.2.3 中间载体的构建 采用 T/A 克隆法,将 DNA 片段 P1234 连接到 pMD19-T Simple Vector 上。由于 Pfu 扩增产物为平末端,DNA 片段 P1234 须先进行加 A 尾反应方可进行 T/A 克隆。最后一轮 PCR 反应结束后,向反应中加入 100 mmol/L 的 dATP 1 μ L 和 2 U/ μ L 的 Taq DNA Polymerase 1 μ L,72 $^{\circ}$ C 保温 30 min。T/A 克隆按试剂盒说明进行,采用蓝白斑筛选 (在平板中事先加入 X-gal/IPTG)。挑取白斑,接种到含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日用碱裂解法小量抽提质粒,鉴定目的基因 DNA 片段是否已经连接到 pMD19-T Simple Vector 上。

1.2.4 含突变位点的真核表达载体的构建 将鉴定正确的含突变位点的质粒 pMD19-T-c.812G>T-KCNQ2 和野生型 pcDNA3.0-KCNQ2 分别以限制

性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切, 酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 Qiagen 胶回收试剂盒分别回收 pMD19-T-c. 812G > T-KCNQ2 的小片段和 pcDNA3.0-KCNQ2 的大片段部分, 回收产物按摩尔比 1:4 混合, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 于 16℃ 连接过夜后, 转化宿主菌 *E. coli* DH5 α , 转化菌涂布于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板, 培养过夜, 挑选生长良好的单菌落接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃ 摇菌过夜, 碱裂解法小量提取质粒。将提取的 pcDNA3.0-c. 812G > T-KCNQ2 用 1% 琼脂糖凝胶电泳初步判断, 并用 ABI 公司 3700 型 DNA 自动测序仪进行序列测定, 验证是否引入突变并排除反应中无随机产生的新的突变。

1.2.5 HEK293 细胞的转染 转染前 1 d, 细胞铺板在 2 mL 含血清、不含抗生素的 DMEM 培养基中 (6 孔板) 正常生长, 使其在转染日细胞密度为 90% ~ 95%; 采用脂质体转染法将 pcDNA3.0-KCNQ2 质粒和绿色荧光蛋白质粒 pRK5-GFP 共转染于 HEK293 细胞, 转染步骤参见试剂盒说明。转染混合物包括: (1) pcDNA3.0-c. 812G > T-KCNQ2 2 μ g, GFP 1 μ g; (2) 野生型 pcDNA3.0-KCNQ2 2 μ g, GFP 1 μ g; (3) 阳性对照组仅加入 GFP 3 μ g; (4) 阴性对照组仅加入空 pcDNA3.0 载体 3 μ g; 各组均加入脂质体 10 μ L。加入无血清 DMEM 培养 3 h 后更换含血清的培养基, 转染后 48 h 在显微镜下观察照相。

1.2.6 免疫荧光化学检测 KCNQ2 蛋白表达 为排除绿色荧光蛋白本身对 KCNQ2 蛋白在细胞内表达和定位的影响, 免疫荧光化学进一步观察野生型和突变蛋白在细胞中的表达。转染 48 h 后将预先用多聚赖氨酸处理的长有细胞的盖玻片从培养皿中取出, 用 PBS 缓冲液洗涤, 4% 低聚甲醛固定液固定 15 min, 用含 0.1 mg/mL 皂苷的 PBS 缓冲液洗涤。5% BSA 室温封闭 10 min, 加一抗羊抗人 KCNQ2-N 末端多克隆抗体 (goat anti-human KCNQ2-N terminal, 稀释度为 1:200), 室温 2 h。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加 FITC 绿色荧光标记的二抗兔抗羊 IgG (rabbit anti-goat IgG, 稀释度为 1:200) 避光 37℃ 孵育 40 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。甘油 PBS 封片, 荧光显微镜下观察照相。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物

第 1 轮和第 2 轮 PCR 反应以野生型质粒 pCD-

NA3.0-KCNQ2 为模板, 用引物 P1 和 P2, P3 和 P4 分别扩增, 得到部分序列互补 (20 bp) 的片段 P12 (888 bp) 和 P34 (1912 bp), 两者都带有点突变。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测表明, 在 888 bp 和 1912 bp 处有明显的产物带, 分别为 P12 和 P34。见图 1。

第 2 轮 PCR 以回收纯化的 DNA 片段 P12 和 P34 为模板, 按约 10 ng 的用量等比例加入, 用引物 P1 和 P4 扩增, 产生带有目的突变的 DNA 片段 P1234 (2800 bp), 回收纯化片段 P1234, 在 2800 bp 处有明显的产物带, 表明是第 3 轮重叠 PCR 的产物。见图 2。

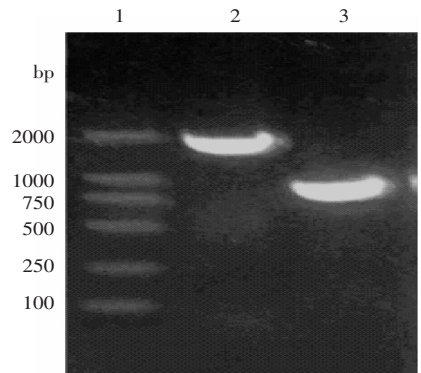


图 1 PCR 扩增片段 P12、P34 电泳图 1: DNA 标记物; 2: 片段 P34 (1912 bp); 3: 片段 P12 (888 bp)。

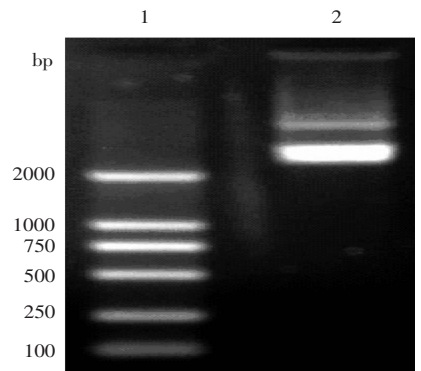


图 2 PCR 扩增片段 P1234 电泳图 1: DNA 标记物; 2: 片段 P1234 (2800 bp)。

2.2 突变真核表达载体的构建

第 3 轮 PCR 产物连接入 pMD19-T Simple Vector 后, 将鉴定正确的含突变位点的质粒 pMD19-T-c. 812G > T-KCNQ2 以限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 2800 bp 处的条带为 P1234, 为含突变点的 DNA 片段。同时利用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切 pcDNA3.0-KCNQ2, 8000 bp 附近的条带为酶切后的目的片段。见图 3。

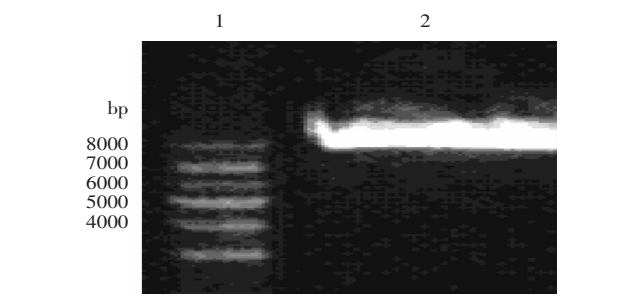


图3 pcDNA3.0-KCNQ2 双酶切电泳图 1: DNA 标记物; 2: 酶切产物。

2.3 含突变位点的真核表达载体 pcDNA3.0-c.812G > T-KCNQ2 的测序鉴定

对构建的含突变位点的真核表达载体 pcDNA3.0-c.812G > T-KCNQ2 用琼脂糖凝胶电泳初步判断后,用 ABI 公司 DNA 自动测序仪进行序列测定,结果显示基因载体上目的突变点突变成功, KCNQ2-cDNA 基因第 812 位核苷酸由 G 变为 T,而其他序列均无改变。见图 4。

2.4 显微镜观察转染进真核表达载体的 HEK293 细胞

在相差显微镜下观察,未转染质粒的 HEK293 细胞贴壁紧密,细胞形状呈现多角不规则形。在激光共聚焦显微镜下观察,未转染质粒的 HEK293 细胞不显示绿色荧光;而共转染 pcDNA3.0-KCNQ2 质粒和 pRK5-GFP 质粒的 HEK293 细胞可见明显的绿

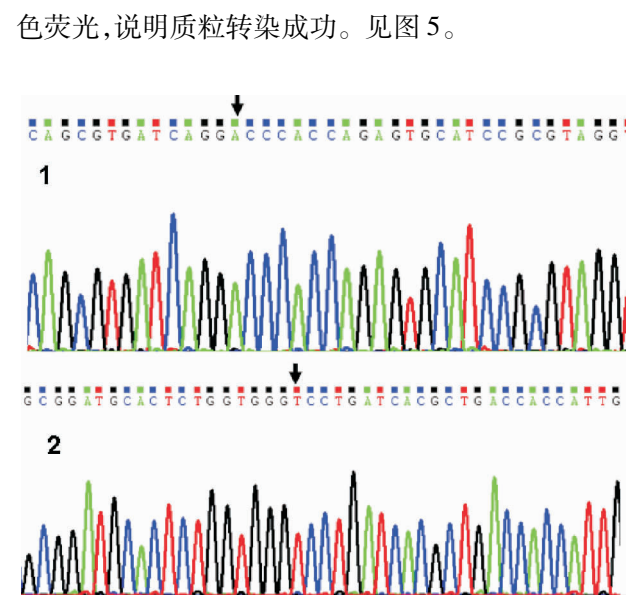


图4 含突变位点的真核表达载体测序结果 1: 反向测序结果; 2: 正向测序结果。箭头指向为突变点 c.812G > T。

2.5 免疫荧光化学检测结果

FITC 绿色荧光标记的野生型 KCNQ2 蛋白和突变型 KCNQ2-c.812G > T 蛋白都在细胞膜上得到表达(图 6),野生型与突变型 KCNQ2-c.812G > T 钾通道具有相似的细胞免疫化学表象,提示 KCNQ2 孔区的点突变 c.812G > T 没有减少蛋白在 HEK293 细胞的表达,没有改变蛋白的细胞内定位。



图5 显微镜下观察 HEK293 细胞(×200) A: 相差显微镜下未转染的 HEK293 细胞; B: 激光共聚焦显微镜下未转染质粒的 HEK293 细胞; C: 激光共聚焦显微镜下转染质粒的 HEK293 细胞。

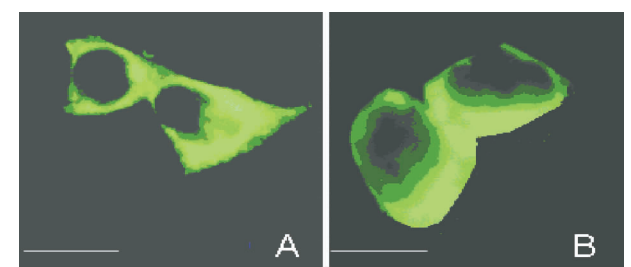


图6 免疫荧光化学检测 KCNQ2 钾通道蛋白在细胞中的表达(标尺 20 μm) A: 突变型 KCNQ2-c.812G > T; B: 野生型 KCNQ2。

3 讨论

KCNQ2 蛋白属于电压门控性钾通道家族,该家族的蛋白亚基结构颇为相似,均含有 6 个疏水跨膜区(S1 ~ S6),其中 S5 和 S6 区之间的保守选择性离子孔区含 1 个电压感受器,另 1 个位于 S4 区,以及在胞浆内的 N 末端和长的 C 末端也包含电压感受器。此家族已知有 5 种可以形成离子孔道的亚单位

基因(*KCNQ1* ~ *KCNQ5*), *KCNQ1* 突变是先天性 QT 间期延长综合征(long QT syndrome)的病因之一^[5], *KCNQ4* 突变引起显性遗传性儿童性耳聋。*KCNQ2*/*KCNQ3* 基因共同编码 M 型钾离子通道,是 BFNC 的致病基因。*KCNQ2* 基因突变时主要引起 M 型钾电流减少,导致神经细胞的兴奋性增高和爆发性放电^[6]。

现已发现多种与癫痫相关的 *KCNQ2* 基因突变,大多数突变是缺失、插入或剪切位点突变^[7],这些突变大多引起阅读框的移位和提前出现的终止密码子,仅报道了少数几种错义突变,它们位于孔区或第 4、5、6 跨膜区^[4]。本研究在一个有 17 位患者的中国 BFIC 大家系中发现了 *KCNQ2* 基因错义突变 c.812G > T,该突变是目前发现的第 3 个 *KCNQ2* 孔区突变。既往研究认为,孔区的突变不影响 *KCNQ2* 在细胞膜上的有效表达,而是通过影响离子的电导使电流幅度减小^[8]。本研究通过脂质体转染使 c.812G > T 突变型和野生型 *KCNQ2* 蛋白在 HEK293 细胞得到了表达,细胞免疫荧光化学结果显示突变型和野生型蛋白都在细胞膜上定位表达,提示 c.812G > T 突变没有影响蛋白在细胞内的表达以及从细胞浆至细胞膜的运输。

c.812G > T 突变导致 *KCNQ2* 钾通道第 271 位甘氨酸被缬氨酸替换(p. G271V),孔区第 271 位甘氨酸在许多动物的 *KCNQ* 家族高度保守,p. G271V 与 Charlier 等^[9]报道的一个 BFNC 家系中的 *KCNQ3* 突变(p. G310V)是孔区同一位置的氨基酸改变,同样是孔区的一个甘氨酸被缬氨酸替换。Charlier 等^[9]在体外表达野生型 *KCNQ3*、*KCNQ3*-p. G310V 与 *KCNQ2*(按 1:1:2 的比例),结果发现,同野生型 *KCNQ3* 与野生型 *KCNQ2* 共表达(按 1:1 的比例)相比,电流幅度减少了 20% ~ 30%。在一个日本家系中发现的 *KCNQ3* 突变 p. W309R 与 p. G310V 相邻,p. W309R 与 *KCNQ2* 野生型在体外共表达根本检测不到钾电流,研究者认为 p. W309R 关闭了钾离子孔道,导致钾离子传导缺陷^[10]。在先天性 QT 间期延长综合征患者中也发现了 *KCNQ1* 同一位置的甘氨酸被替换(p. G306R)^[11]。P. G306R 在体外表达时,钾电流显著减弱,而且这种减弱不能被特异性激活剂 R-L3 所挽救,研究者认为 p. G306R 突变可能破坏了药物激活通道的关键位点^[12]。

最早 *KCNQ2* 突变被认为与呈良性经过的 BFNC 有关,后来在对抗癫痫药耐药的癫痫性脑病患儿及惊厥伴精神发育迟滞的患儿中也发现了 *KCNQ2* 突变^[13-14]。国内王家勤等^[15]将一个 BFIC

大家系的疾病基因定位于 *KCNQ2* 基因所在的染色体区域 20q13.3。Ishii 等^[16]在非家族性良性新生儿惊厥患者中发现了 *KCNQ2* 基因突变;Neubauer 等^[17]在运动性癫痫家系和散发特发性全身性癫痫患者中发现了多个 *KCNQ2*/*KCNQ3* 基因突变。说明 *KCNQ2* 基因突变不只局限于典型的 BFNC 家系中,需要将基因型、表现型、突变蛋白结构、功能及其调节机制相结合进行研究。

目前 *KCNQ* 钾通道成为抗癫痫药物的一个新靶点。具有 M 通道开放作用的瑞替加滨(retigabine)对许多癫痫模型动物有效,目前已完成抗癫痫药物的 I 期和 IIa 期临床试验,欧-美多中心 IIb 期临床试验正在进行中^[18]。氟吡啶是德国研制和开发的镇痛药,最近发现,氟吡啶与瑞替加滨一样,是 M 通道开放剂,在转染 *KCNQ2*/*KCNQ3* 基因的 HEK293 细胞中,氟吡啶能显著增大 *KCNQ2*/*KCNQ3* 通道的电流反应。氟吡啶与瑞替加滨有望用于治疗对现行药物耐药的难治性癫痫。

综上所述,本研究应用重叠延伸 PCR 方法对 *KCNQ2* 基因进行定点突变,构建了突变 *KCNQ2* 基因真核表达载体,在 HEK293 细胞表达系统成功地进行了蛋白表达,下一步的工作将研究突变型与野生型 *KCNQ2* 在细胞上的功能差异,从而在蛋白质和电生理水平上进一步阐明该突变点导致惊厥的发病机制,并为下一步的药物干预研究奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] Tang B, Li H, Xia K, Jiang H, Pan Q, Shen L, et al. A novel mutation in *KCNQ2* gene causes benign familial neonatal convulsions in a Chinese family[J]. J Neuro Sci, 2004, 221(1-2): 31-34.
- [2] 周熙惠, 马爱群, 刘小红, 黄辰, 张艳敏, 史瑞明. 良性家族性婴儿惊厥家系 *KCNQ2* 基因新突变[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(7): 487-491.
- [3] Miceli F, Soldovieri MV, Martire M, Tagliatalata M. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(1): 65-74.
- [4] Volkers L, Rook MB, Das JH, Verbeek NE, Groenewegen WA, van Kempen MJ, et al. Functional analysis of novel *KCNQ2* mutations found in patients with benign familial neonatal convulsions[J]. Neurosci Lett, 2009, 462(1): 24-29.
- [5] Viadero MT, Rubín E, Amigo T, González-Lamuño D. Three generations of hereditary long-QT syndrome with complete penetrance caused by the p. G316E *KCNQ1* mutation[J]. Pediatr Cardiol, 2011, 32(1): 102-104.
- [6] Otto JF, Yang Y, Frankel WN, White HS, Wilcox KS. A spontaneous mutation involving *Kcnq2* (Kv7.2) reduces M-current density and spike frequency adaptation in mouse CA1 neurons[J]. J Neurosci, 2006, 26(7): 2053-2059.
- [7] Heron SE, Cox K, Grinton BE, Zuberi SM, Kivity S, Afawi Z, et

al. Deletions or duplications in KCNQ2 can cause benign familial neonatal seizures[J]. J Med Genet, 2007, 44(12): 791-796.

[8] Uehara A, Nakamura Y, Shioya T, Hirose S, Yasukochi M, Uehara K. Altered KCNQ3 potassium channel function caused by the W309R pore-helix mutation found in human epilepsy[J]. J Membr Biol, 2008, 222(2): 55-63.

[9] Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family[J]. Nat Genet, 1998, 18(1): 53-55.

[10] Sugiura Y, Nakatsu F, Hiroyasu K, Ishii A, Hirose S, Okada M, et al. Lack of potassium current in W309R mutant KCNQ3 channel causing benign familial neonatal convulsions (BFNC) [J]. Epilepsy Res, 2009, 84(1): 82-85.

[11] Seeböhm G, Scherer CR, Busch AE, Lerche C. Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome[J]. J Biol Chem, 2001, 276(17): 13600-13605.

[12] Seeböhm G, Pusch M, Chen J, Sanguinetti MC. Pharmacological activation of normal and arrhythmia-associated mutant KCNQ1 potassium channels[J]. Circ Res, 2003, 93(10): 941-947.

[13] Dedek K, Fusco L, Teloy N, Steinlein OK. Neonatal convulsion and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2[J]. Epilepsy Res, 2003, 54(1): 21-27.

[14] Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, et al. A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation[J]. Neurology, 2004, 63(1): 57-65.

[15] 王家勤, 李红梅, 尹景岗, 张红亚, 李冲, 顾仁骏, 等. 良性家族性婴儿惊厥一家系基因定位及钾离子通道基因测序研究[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(9): 513-517.

[16] Ishii A, Fukuma G, Uehara A, Miyajima T, Makita Y, Hamachi A, et al. A de novo KCNQ2 mutation detected in non-familial benign neonatal convulsions[J]. Brain Dev, 2009, 31(1): 27-33.

[17] Neubauer BA, Waldegger S, Heininger J, Hahn A, Kurlemann G, Fiedler B, et al. KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes[J]. Neurology, 2008, 71(3): 177-183.

[18] Lange W, Geissendörfer J, Schenzer A, Grötzinger J, Seeböhm G, Friedrich T, et al. Refinement of the binding site and mode of action of the anticonvulsant Retigabine on KCNQ K⁺ channels [J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(2): 272-280.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

《实用新生儿学》第四版出版

由邵肖梅、叶鸿瑁、丘小汕教授主编的《实用新生儿学》第四版于2011年1月正式出版。这一版继承了金汉珍、黄德珉和官希吉教授主编的前三版实用、先进的基本风格,所有章节都作了不同程度的修订,既注重临床医学新发展、新技术、新方法的具体介绍,又详细叙述了学科发展的新理论、新动态、新思路。本版对不少疾病的病因和发病机制有了新的阐述,对新的治疗方法、仪器和药物作了详尽的介绍。总字数比第三版增加了1/4。本版的编写队伍中,三分之二是具有博士学位、活跃在新生儿临床第一线的中青年医学专家,他们的加入使本版内容的与时俱进有了可靠的保证,是从事新生儿临床医务工作者案头必备的参考书。

因近期发现有不法分子盗版本书,请读者注意本书为人民卫生出版社出版,字数226万,售价156元,请到正规书店购买。