

先天性QT间期延长综合征相关基因 SCN5A 定点突变及蛋白表达研究

史瑞明 强华 张艳敏 马爱群 高洁

(西安交通大学医学院第一附属医院儿科,陕西 西安 710061)

[摘要] **目的** 构建先天性QT间期延长综合征相关基因SCN5A-delQKP1507-1509突变型真核表达载体,并观察其在人胚肾293(HEK293)细胞中的表达。**方法** 采用一步法构建SCN5A-delQKP1507-1509突变型真核表达载体PEGFP-delQKP-hH1,用脂质体转染法将野生型和突变型质粒分别转染HEK293细胞,激光共聚焦显微镜观察钠通道蛋白在HEK293细胞的表达与定位,Western blot检测其蛋白表达。**结果** 经电泳及DNA测序显示突变型1507-1509位点成功缺失9个碱基,野生型与突变型均在HEK293细胞膜上表达,且表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 成功构建钠通道基因SCN5A-delQKP1507-1509突变型真核表达载体,并在HEK293细胞中表达,为进一步研究其功能奠定基础。
[中国当代儿科杂志,2013,15(3):223-226]

[关键词] 先天性QT间期延长综合征;SCN5A基因;定点突变;真核表达载体;人胚肾293细胞

Site-directed mutagenesis and protein expression of SCN5A gene associated with congenital Long QT syndrome

SHI Rui-Ming, QIANG Hua, ZHANG Yan-Min, MA Ai-Qun, GAO Jie. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Email: srm1975@sohu.com)

Abstract: Objective To construct the sodium channel gene SCN5A-delQKP1507-1509 mutation associated with congenital long QT syndrome, and its eukaryotic expression vector, and to examine the expression of mutation protein in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. **Methods** Eukaryotic expression vector PEGFP-delQKP-hH1 for SCN5A-delQKP1507-1509 mutation was constructed by rapid site-directed mutagenesis. HEK293 cells were transfected with the wild or mutant vector using lipofectamine, and then subjected to confocal microscopy. The transfected cells were immunostained to visualize intracellular expression of the mutant molecules. **Results** Direct sequence and electrophoresis analysis revealed 9 basic group absences at position 1507-1509. The delQKP1507-1509 mutation eukaryotic expression vector was expressed in HEK293 cells. Immunostaining of transfected cells showed the expression of both wild type and mutant molecules on the plasma membrane and there was no difference in the amount of protein, which suggested that the mutant delQKP1507-1509 did not impair normal protein expression in HEK293 cells. **Conclusions** Successful construction of mutant SCN5A-delQKP1507-1509 eukaryotic expression vector and expression of SCN5A protein in HEK293 cells provides a basis for further study on the functional effects of congenital long QT syndrome as a cause of SCN5A mutation.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(3):223-226]

Key words: Congenital long QT syndrome; SCN5A gene; Site-directed mutagenesis; Eukaryotic expression vector; Human embryonic kidney 293 cell

QT间期延长综合征(long QT syndrome, LQTS)是一组临床上以QT间期延长,尖端扭转性室速、室颤,发作性晕厥以及心源性猝死为特征的临床综合征^[1]。先天性LQTS的发病机制与编码心肌离子通道蛋白的基因异常有关。迄今发现了至少13个先天性LQTS相关基因并进行了研究,但其发病机制仍不十分清楚。本课题组在一个3代人先天性

LQTS家系中发现了一个钠通道SCN5A基因第26号外显子有9个碱基缺失突变,导致其编码的第1507位谷氨酰胺、第1508位赖氨酸和第1509位脯氨酸3个氨基酸缺失,即SCN5A-delQKP1507-1509突变^[2]。然而,该突变体对钠通道在心肌细胞中的表达、定位和功能是否有影响尚未见相关报道。本研究通过一步法构建SCN5A-delQKP1507-1509突

[收稿日期]2012-11-02;[修回日期]2012-11-19

[基金项目]国家自然科学基金(30900580)。

[作者简介]史瑞明,女,博士,副主任医师。

变型真核表达载体,并观察其在人胚肾 293 (HEK293)细胞中的表达与定位,为进一步研究该缺失突变的功能变化,及其与 LQTS 发病的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293 细胞株(西安交通大学第一附属医院心内科实验室提供)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)、真核表达质粒 PEGFP-hH1(英国 Manchester 大学 Junhong Gui 博士惠赠)、QuikChange[®] XL Site Directed Mutagenesis 试剂盒(美国 Stratagene 公司)、Lipofectamine[™] 2000 脂质体转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司)、蛋白酶抑制剂试剂盒(美国 Gibco 公司)、兔抗人 Nav1.5 抗体(北京友谊中联生物科技有限公司)、FITC 标记山羊抗兔二抗(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PEGFP-delQKP-hH1 真核表达载体的构建

本研究拟构建 SCN5A 钠通道 1507-1509 位氨基酸缺失突变真核表达载体,即在野生型 PEGFP-hH1 质粒中缺失 CAGAAGCCC 9 个碱基。根据 QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis 试剂盒的要求,引物设计如下: 5'-GGCTCCAAGAAGCCCATCCACGGC CCC-3', 5'-CAGGGGCCGTGGGATGGGCTTCTTGGAGC C-3'。严格按照试剂盒的说明书进行操作。提取质粒后,琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆,突变结果由北京奥科生物技术有限责任公司进行 DNA 测序。

1.2.2 转染 HEK293 细胞

HEK293 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。转染前 1 d,细胞铺板在 500 μ L 含血清、不含抗生素的 DMEM 培养基中(24 孔板),使其在转染当天密度为 50% ~ 60%。采用 Lipofectamine[™] 2000 脂质体转染法分别转染质粒 PEGFP-hH1、PEGFP-delQKP-hH1 到 HEK293 细胞,每孔细胞用 50 μ L 无血清培养基稀释 0.6 μ g 质粒和 1.5 μ L Lipofectamine[™] 2000,严格按照试剂盒说明书进行操作。转染后放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱,6 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养 48 h 后进行实验。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察 SCN5A 钠通道蛋白在细胞中的定位

将预先经明胶处理过的无菌性盖玻片放入 6 孔板中,取对数生长期的 HEK293 细胞铺于板上。培养 12 h 后,将 PEGFP-hH1 野生型和突变型质粒分别转染入 HEK293 细胞,48 h 后弃去

DMEM 并用 PBS 洗 2 遍。取干净的载玻片在中央滴 1 滴 PBS,将孔中的盖玻片取出,正面向下放入载玻片中央的 PBS 滴中,使盖玻片吸附在载玻片上。将载玻片放到激光共聚焦显微镜上观察并照相。

1.2.4 Western blot 检测突变对蛋白表达水平的影响

提取细胞总蛋白后,以牛血清白蛋白作为标准品,采用 Bradford 法测定样品蛋白浓度。先后经 8% SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜,1:200 稀释的兔抗人 Nav1.5 抗体,Western blot 检测细胞内 SCN5A 钠通道蛋白水平。利用 Syngene Chemi-Genius 成像系统照相。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计学分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 PEGFP-delQKP-hH1 真核表达载体

挑取克隆,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PEGFP-hH1 突变型与野生型质粒,比较可见突变型与野生型质粒大小基本相同。DNA 测序结果表明 PEGFP-hH1 突变型基因载体上目的突变点突变成功,缺失 CAGAAGCCC 共 9 个碱基,而其他序列均无改变。见图 1 ~ 2。

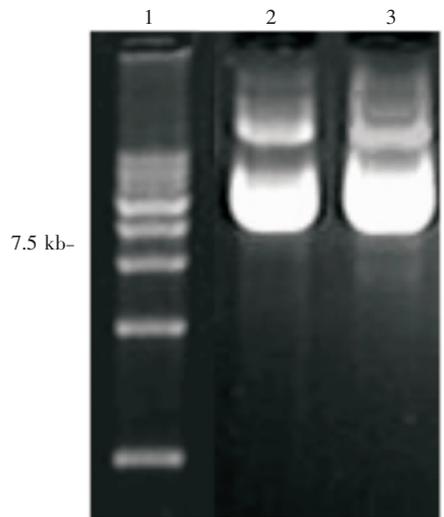


图 1 PEGFP-hH1 野生型与突变型质粒电泳图 1 为 marker,2 为野生型质粒,3 为突变型质粒。突变型与野生型质粒大小基本相同。

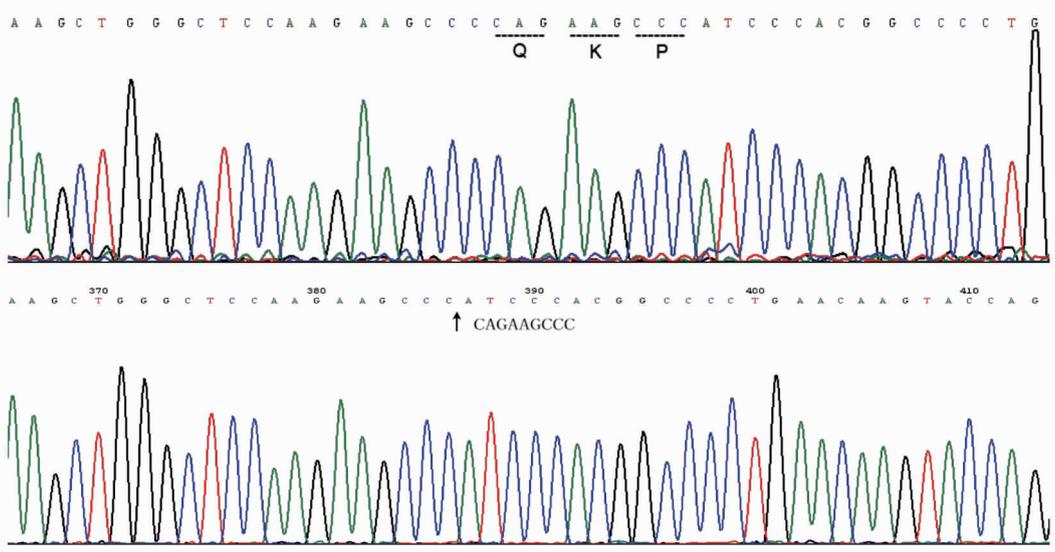


图2 PEGFP-hH1 野生型与突变型质粒测序结果 上图为野生型质粒测序结果;下图为突变型质粒测序结果,箭头所示为突变型缺失 CAGAAGCCC 9 个碱基的位置。

2.2 激光共聚焦显微镜观察钠通道蛋白的表达与定位

激光共聚焦显微镜下观察野生型和突变型钠通道蛋白在细胞膜上的表达,可见两者在细胞膜上均有表达,且荧光强度差别不大。见图3。

道蛋白在 HEK293 细胞上的表达,两者均在 220 kD 处有条带表达,且野生型钠通道蛋白(0.57 ± 0.08)与突变型钠通道蛋白(0.55 ± 0.10)表达量相似,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图4。

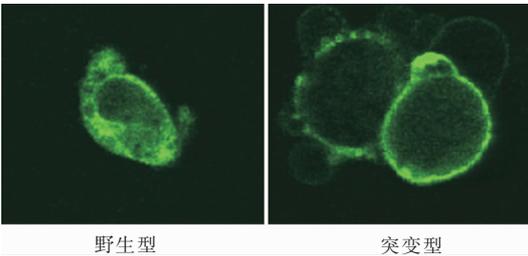


图3 激光共聚焦显微镜观察钠通道蛋白在 HEK293 细胞的表达与定位 野生型和突变型钠通道蛋白在 HEK293 细胞膜上均有表达,且荧光强度差别不大。

2.3 Western blot 检测钠通道蛋白的表达

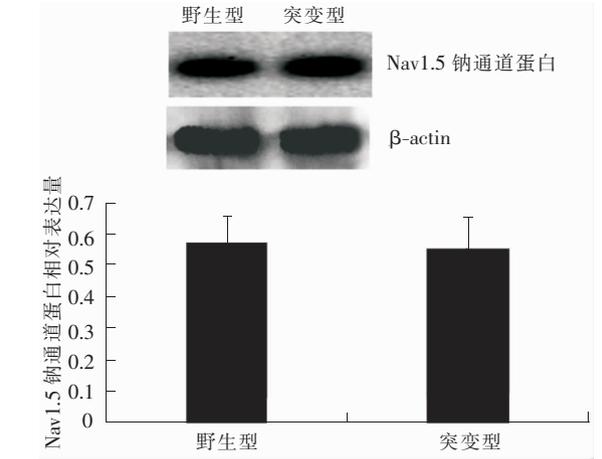


图4 Western blot 检测钠通道蛋白的表达 ($n = 6$)

Western blot 检测野生型和 delQKP 突变型钠通

3 讨论

LQTs 是一组临床上以 QT 间期延长、尖端扭转性室速、室颤,发作性晕厥以及心源性猝死为特征的综合征。按病因 LQTs 可分为先天性和获得性两种类型。先天性 LQTs 通常具有家族遗传史,其发病机制是由于编码心肌离子通道蛋白的基因异常导致心肌细胞膜离子通道功能障碍,引起心室复极

明显延长^[3-4]。LQTs 具有多种亚型,其中 LQT1、LQT2 和 LQT3 是临床上最为常见的 3 种 LQTs。

迄今发现了至少 13 个 LQTs 相关基因^[5],分别与不同亚型的 LQTs 有关。研究显示,基因突变主要影响离子通道蛋白正常转运至细胞膜、干扰蛋白正确组装、影响通道功能等,从而引起临床表现^[6]。由 SCN5A 基因突变引起的 LQTs 称为 LQT3,该基因位于人染色体 3p21.24,整个基因由 28 个外显子组成,约有 80 kb,编码心肌钠通道 α 亚基。对大部分

LQT3 突变位点的研究显示突变可使通道失活发生故障,在动作电位平台期和复极化期存在持续钠电流导致心室动作电位时程延长,称为钠通道“功能获得性突变”^[7]。但仍有部分 SCN5A 突变位点的功能并非“功能获得性”或尚不清楚^[8],也有些引起持续晚钠电流的突变并不延长 QTc 间期,临床表现不是 LQTs 而是 Brugada 综合征^[9]。因此,深入研究 LQTs 发病机制,并针对不同发病机制展开个体化治疗对于改善 LQTs 患者预后具有重要的意义。

课题组前期工作调查了一个 3 代人 LQTs 家系。该家系先证者为一名 13 岁儿童,以反复晕厥伴有抽搐就诊,心电图显示 QT 间期明显延长。家族中其父亲和姑姑分别于青壮年时猝死,奶奶亦患相同疾病且心电图 QT 间期延长,诊断 LQTs 明确。进一步的基因检测发现家系患者 SCN5A 基因第 26 号外显子 CAGAAGCCC 共 9 个碱基缺失,即 SCN5A-delQKP1507-1509 突变,该家系属于 LQT3。

钠通道 α 亚基是由 4 组跨膜区(DI ~ DIV)组成的功能性蛋白孔道,各跨膜区域之间均由多肽链连接组成四联体。SCN5A 基因突变 delQKP1507-1509 位于 DIII 和 DIV 跨膜区之间的细胞内链上,该位点位于钠通道失活阀门所在区域。正常钠通道的有效关闭对心肌复极化非常关键,有赖于失活阀门和其受体的结构、功能正常。位于 DIII 及 DIV 跨膜区连接链中段的疏水性氨基酸和甘氨酸、脯氨酸侧链共同起到阀门的作用。失活阀门临近位点 SCN5A 突变,如 delK1500, delKPQ1505-1507 的功能研究提示,突变可引起持续钠电流,可能通过影响失活阀门蛋白立体构象而影响正常的阀门关闭过程^[10-11]。本研究突变点位于钠通道失活阀门所在区域,经激光共聚焦和 Western blot 检测均证实该突变并未影响钠通道蛋白的正常转运和表达,推测其可能影响到通道蛋白质的空间立体构象,进而影响钠通道阀门与受体的正常结合,导致通道不能正常关闭,引起晚钠电流异常存在,从而导致心室动作电位时程延长。

综上所述,本研究成功构建了钠通道基因

SCN5A-delQKP1507-1509 突变体真核表达载体,并在 HEK293 细胞上表达,进一步的工作将研究野生型与突变型钠通道的功能差异,从而为阐明 LQTs 的发病机制,以及通道活性药物应用的研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Brenyo AJ, Huang DT, Aktas MK. Congenital long and short QT syndromes[J]. *Cardiology*, 2012, 122(4): 237-247.
- [2] Shi R, Zhang Y, Yang C, Huang C, Zhou X, Qiang H, et al. The cardiac sodium channel mutation delQKP1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death[J]. *Eurpace*, 2008, 10(11): 1329-1335.
- [3] Hedley PL, Jørgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, et al. The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update[J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(11): 1486-1511.
- [4] Horigome H, Nagashima M, Sumitomo N, Yoshinaga M, Ushinohama H, Iwamoto M, et al. Clinical characteristics and genetic background of congenital long-QT syndrome diagnosed in fetal, neonatal, and infantile life: a nationwide questionnaire survey in Japan[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010, 3(1): 10-17.
- [5] Roberts JD, Gollob MH. The genetic and clinical features of cardiac channelopathies[J]. *Future Cardiol*, 2010, 6(4): 491-506.
- [6] Cerrone M, Napolitano C, Priori SG. Genetics of ion-channel disorders[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2012, 27(3): 242-252.
- [7] Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, et al. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2219-2229.
- [8] Eckardt L. LQT3: who is at risk for sudden cardiac death? [J]. *Heart Rhythm*, 2009, 6(1): 121-122.
- [9] Rivolta I, Abriel H, Tateyama M, Liu H, Memmi M, Vardas P, et al. Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33): 30623-30630.
- [10] Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies - an update on mutations and mechanisms [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 98(2-3): 120-136.
- [11] Morita H, Wu J, Zipes DP. The QT syndromes; long and short [J]. *Lancet*, 2008, 372(9640): 750-763.

(本文编辑:周勇)