

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01243

· 研究快报 ·

# 载有人心肌细胞钠离子通道及 *PRKAG2* 基因的 HEK-293T 细胞模型的建立

王 君<sup>1,2</sup>, 郑 兴<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院心内科, 上海 200433

2. 大连市第五人民医院心内科, 大连 116000

**[摘要]** **目的** 尝试建立类似 *PRKAG2* 心脏综合征钠离子通道功能的 HEK-293T 细胞模型, 为探讨 *PRKAG2* 心脏综合征心律失常机制奠定基础。**方法** 分别构建人 *PRKAG2* 基因质粒载体和 *SCN5A* 基因质粒载体, 共转染人胚肾细胞 (HEK-293T); 应用免疫荧光法、Real-time PCR、蛋白质印迹法检测 HEK-293T 细胞转染结果及基因表达情况。**结果** 转染 48 h 后, HEK-293T 细胞在细胞免疫荧光显微镜下可见红色荧光和绿色荧光。Real-time PCR 及蛋白印迹结果证实: 单独转染 *SCN5A* 组、*SCN5A*+*PRKAG2* 组、*SCN5A*+*G100S* 组、*SCN5A*+*R302Q* 组 *SCN5A* 基因及蛋白均有表达, 而在空白对照组无表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); *SCN5A*+*PRKAG2* 组 *PRKAG2* 基因及蛋白高表达, 而空白对照组、*SCN5A* 组、*SCN5A*+*R302Q* 组、*SCN5A*+*G100S* 组表达量较低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 成功建立类似 *PRKAG2* 心脏综合征钠离子通道的 HEK-293T 细胞模型, 为后续研究奠定了基础。

**[关键词]** *PRKAG2* 综合征; 心肌细胞; 钠通道; 人胚肾细胞; 共转染

**[中图分类号]** R 541 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)11-1243-04

## Establishing HEK-293T cell model carrying human sodium channel and *PRKAG2* gene

WANG Jun<sup>1,2</sup>, ZHENG Xing<sup>1\*</sup>

1. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Cardiology, The Fifth People's Hospital of Dalian, Dalian 116000, Liaoning, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a HEK-293T cell model with sodium channel function similar to that in *PRKAG2* syndrome. **Methods** Vectors of *PRKAG2* gene and *SCN5A* gene were constructed and were used to co-transfect HEK-293T cells. Immunofluorescence, real-time PCR and Western blotting analysis were used to examine the transfection results and the expression of interested mRNA and protein. **Results** Immunofluorescence findings showed red fluorescence and green fluorescence in HEK-293T cells 48 hours after co-transfection. Real-time PCR and Western blotting analysis showed *SCN5A* expression in pure *SCN5A* group, *SCN5A* + wild-type group, *SCN5A* + *R302Q* mutant group, and *SCN5A* + *G100S* mutant group, but not in the blank control group, showing significant significance ( $P < 0.05$ ). Expression of *PRKAG2* gene and protein in *SCN5A*+*PRKAG2* group was significantly higher than those in the blank control group, pure *SCN5A* group, *SCN5A*+*R302Q*, and *SCN5A*+*G100S* groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** We have successfully established a HEK-293T cell model with sodium channel function similar to that in *PRKAG2* syndrome, paving a way for future study.

**[Key words]** *PRKAG2* syndrome; cardiac myocytes; sodium channels; HEK-293T cells; co-transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1243-1246]

*PRKAG2* 心脏综合征是由于编码单磷酸腺苷激活蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)  $\gamma 2$  亚基的 *PRKAG2* 基因发生点突变而导致的罕见常染色体显性遗传性心脏

病, 主要表现为家族性心肌肥厚、心室预激和心肌糖原沉积<sup>[1-2]</sup>。与预激综合征等不同, *PRKAG2* 心脏综合征所致心室预激等心律失常的发病机制尚不清楚, 值得深入探讨。因此, 本研究拟建立载有人心肌

**[收稿日期]** 2014-03-11 **[接受日期]** 2014-10-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170092)。Supported by National Natural Science Foundation of China(81170092)。

**[作者简介]** 王 君, 硕士。E-mail: wangjunsmmu@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-31161262, E-mail: zhengxing57530@163.com

细胞钠离子通道及 AMPK  $\gamma$ 2 亚基的 HEK-293T 细胞模型,为进一步研究 PRKAG2 心脏综合征心律失常发病机制奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 质粒 pCDH-GFP、质粒 p3 $\times$ FLAG-CMV-7.1、PRKAG2 基因、HEK-293T 细胞由本实验室保存,转染试剂 Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 购自美国 Invitrogen 公司,人心肌细胞钠离子通道(SCN5A)基因由华大基因合成,其他试剂购自 Invitrogen、TaKaRa 公司、Biotek Corporation、国药集团、碧云天生物工程有限公司、上海国药等公司。

1.2 质粒载体的构建及转染 通过 PCR 技术扩增目的基因,后将载体与目的基因通过酶切反应及连接反应构建质粒载体,构建 SCN5A 过表达载体 pCDH-GFP-SCN5A 及 PRKAG2 过表达载体 p3 $\times$ FLAG-CMV-7.1-PRKAG2,应用突变试剂盒在载体 p3 $\times$ FLAG-CMV-7.1-PRKAG2 基础上构建 R302Q 突变体及 G100S 突变体载体。按每孔  $2 \times 10^5$  个 HEK-293T 细胞,质粒( $\mu$ g): Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 ( $\mu$ L)=1:2 进行转染,置于细胞培养箱 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h。在 4~6 h 的时候可以取出培养板,小心吸去培养基,每孔加 1 mL 新鲜的含 10% 血清 H-DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 继续培养 48 h。

1.3 HEK-293T 细胞免疫荧光染色 载体 p3 $\times$ FLAG-CMV-7.1-PRKAG2 载有 GFP 绿色荧光标记蛋白基因,载体 pCDH-GFP-SCN5A 载有 FLAG 标签蛋白基因,经过细胞免疫荧光染色后,可在荧光显微镜下看到红色荧光。HEK-293T 细胞共转染 48 h 后在荧光显微镜下观察细胞荧光情况。

1.4 HEK-293T 细胞 real-time PCR 验证 共转染 48 h 后的 HEK-293T 细胞,提取细胞总 RNA 进行 real-time PCR 验证。首先提取总 RNA,而后合成 cDNA,最后进行 Real-time PCR 反应。

1.5 HEK-293T 细胞 Western 印迹验证 共转染 48 h 后的 HEK-293T 细胞,提取细胞总蛋白进行 Western 印迹验证。先将各组细胞进行蛋白质抽提及浓度鉴定,之后进行 SDS-PAGE 电泳、蛋白质转移、蛋白质显像、免疫检测、化学发光检测。

1.6 统计学处理 采用 SPSS14.0 统计软件对实验数据进行分析,所有计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,检验水准( $\alpha$ )=0.05。

### 2 结果

2.1 转染后 HEK 293T 细胞荧光检测 结果(图 1)发现:各组在曝光量相同情况下,SCN5A(S)组可见绿色荧光标记,SCN5A+PRKAG2 野生型组(S+P)、SCN5A+G100S 组(S+G)、SCN5A+R302Q 组(S+R)细胞内均可见绿色和红色荧光标记,表明 PRKAG2 基因及 SCN5A 基因均被转染入细胞内。

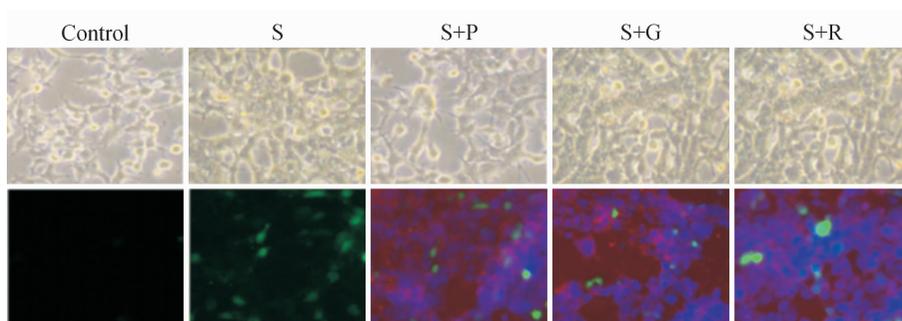


图 1 转染后 HEK-293T 细胞免疫荧光染色

Fig 1 Immunofluorescence staining of co-transfected HEK-293T cells

S: SCN5A; S+P: SCN5A+PRKAG2; S+G: SCN5A+G100S; S+R: SCN5A+R302Q. Original magnification:  $\times 100$

2.2 转染后 HEK-293T 细胞 real-time PCR 验证 结果表明:SCN5A 组、SCN5A+PRKAG2 野生型组、SCN5A+R302Q 组、SCN5A+G100S 组 SCN5A 基因均表达,而空白对照组未表达(图 2A),

差异有统计学意义( $P < 0.01$ );SCN5A+PRKAG2 野生型组 PRKAG2 基因高表达,而 SCN5A 组、SCN5A+R302Q 组、SCN5A+G100S 组表达量较低(图 2B),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

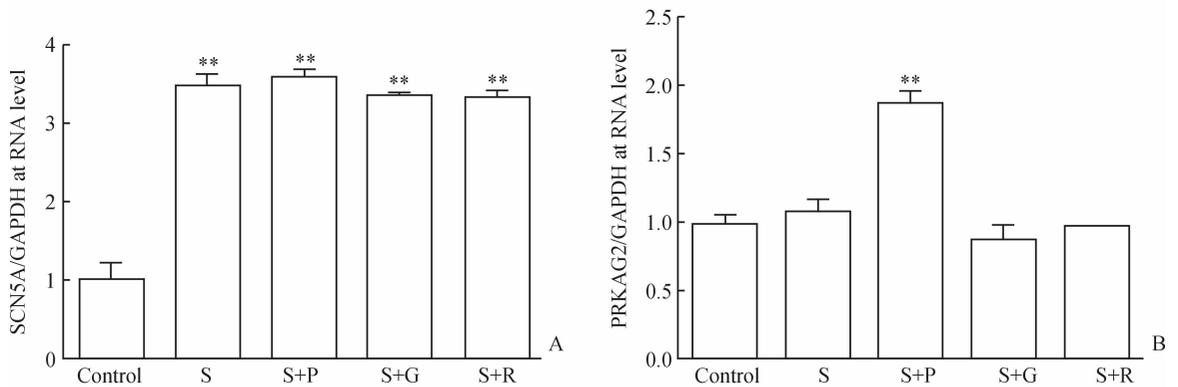


图 2 转染后 HEK-293T 细胞 real-time PCR 验证

Fig 2 Real-time PCR verification of co-transfected HEK-293T cells

A: SCN5A RNA; B: PRKAG2 RNA. S: SCN5A; S+P: SCN5A+PRKAG2; S+G: SCN5A+G100S; S+R: SCN5A+R302Q group. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 9$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 转染后 HEK-293T 细胞的 Western 印迹验证 结果(图 3)表明:与空白对照组相比 Nav 1.5 蛋白在 SCN5A 组(S)、SCN5A+PRKAG2 野生型组(S+P)、SCN5A+R302Q 组(S+R)、SCN5A+G100S 组(S+G)均有表达,表达量基本相同,而在空白对照组无表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与空白对照组相比,AMPKR2(PRKAG2 基因编码蛋白)在 S+P 组高表达,而在 S 组、S+R 组、S+G 组表达量较低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是由 1 个催化亚基( $\alpha$ )和 2 个调节亚基( $\beta$ 、 $\gamma$ )组成的异源三聚体复合物。其中  $\alpha$  亚单位的 Thr-172 位点是调节 AMPK 功能的至关重要的磷酸化位点; $\beta$  亚基包含 2 个保守的区域——中间的糖原结合区和 C-末端与其他两个亚基的结合区; $\gamma$  亚基包含 4 个 cystathionine- $\beta$ -synthase 串联重复序列,组成 2 个 Bateman 域,每个 Bateman 域能结合 1 个 AMP 或 ATP。AMPK 的活化主要通过以下 3 种机制:(1)变构激活;(2)通过 AMPK 的上游激酶(AMPKKs)促使  $\alpha$  亚基 Thr-172 的磷酸化;(3)抑制 PPS 的去磷酸化作用。AMPK 是重要的能量调节酶,通过增加产能和减少耗能来弥补能量不足<sup>[1-2]</sup>。经过研究发现,AMPK 参与了多种心脏病发生和发展,包括心肌肥厚、心力衰竭、心肌缺血再灌注损伤以及调节心肌细胞离子通道功能,研究发现调节 AMPK 活性可使心脏获益<sup>[4-6]</sup>。因此人们越来越认识到,AMPK 对心脏来说起着至关重要的作用<sup>[1,3]</sup>,极有可能成为未来心脏病治疗的新靶点。

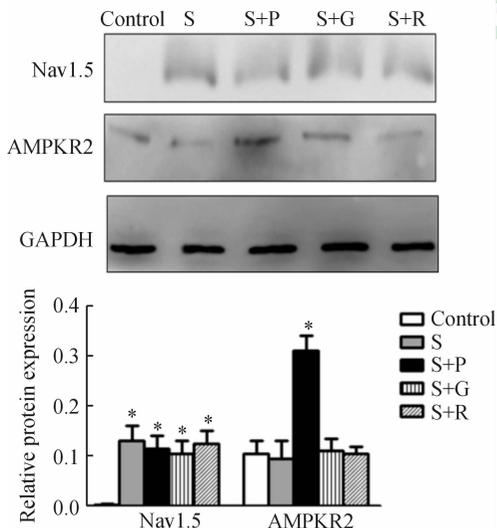


图 3 转染后 HEK-293T 细胞的 Western 印迹验证

Fig 3 Western blotting analysis for verification of co-transfected HEK-293T cells

S: SCN5A; S+P: SCN5A+PRKAG2; S+G: SCN5A+G100S; S+R: SCN5A+R302Q. \*  $P < 0.05$  vs control group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

心脏的电压-门控钠离子通道是位于心肌细胞的细胞膜跨膜蛋白。钠通道由  $\alpha$  亚基及  $\beta$  亚基组成,其中  $\alpha$  亚基——Nav1.5(由 SCN5A 基因编码)由 4 个结构域(D I ~D IV)组成,每个结构域包含 6 个跨膜  $\alpha$ -螺旋片段(S1~S6),其中每个结构域的带正电荷的 S4 形成了电压感应器,在细胞膜去极化时

促使通道激活,S5、S6 组成了钠离子孔道<sup>[7-8]</sup>。通过钠离子孔道进入心肌细胞内的钠离子参与了心肌细胞0期快速去极化,在心肌细胞电活动的产生及传导过程中起着核心作用。在生理情况下,钠离子通道的激活和失活受到严格调控,从而保持心肌的兴奋性。先天性或获得性钠离子通道功能异常可导致致命性心律失常的发生,PRKAG2 心脏综合征就是由于编码 AMPK  $\gamma 2$  亚基(由 PRKAG2 基因编码)的基因点突变的先天性心脏病。Light 等<sup>[9]</sup>研究发现 PRKAG2 突变体可导致钠通道失活延迟,进而导致心律失常。2007年由张静等<sup>[10]</sup>首次发现汉族人 PRKAG2 心脏综合征家系,对该家系进行基因分析发现了一个新的 PRKAG2 基因突变位点——G100S,该位点区别于之前发现的所有突变位点,它位于非 CBS 区域。通过对 PRKAG2 基因非 CBS 区域的 G100S 突变进行功能研究,可以明确这一新突变在汉族人 PRKAG2 心脏综合征家系心律失常发病中的作用通路,并加深对 AMPK $\gamma 2$  亚基非 CBS 区域的功能认识,对全面阐述 AMPK $\gamma 2$  亚基在遗传性心脏病中的作用具有重要价值。

本实验通过将编码人心肌细胞钠离子通道的 SCN5A 基因质粒载体及 PRKAG2 基因质粒载体共转染 HEK-293T 细胞,建立了 PRKAG2 基因突变体对心肌细胞钠离子通道影响的研究模型,从而为研究 PRKAG2 G100S 突变体对 PRKAG2 心脏综合征心律失常发病机制的影响奠定了基础。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Arad M, Seidman C E, Seidman J G. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease[J]. *Circ Res*, 2007, 100: 474-488.

[2] Xiao B, Sanders M J, Underwood E, Heath R, Mayer F V, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP[J]. *Nature*, 2011, 472: 230-233.

[3] Zhang L N, Xu L, Zhou H Y, Wu L Y, Li Y Y, Pang T, et al. Novel small-molecule AMP-activated protein kinase allosteric activator with beneficial effects in db/db mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e72092.

[4] Chan A Y, Dolinsky V W, Soltys C L, Viollet B, Baksh S, Light P E, et al. Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 24194-24201.

[5] Shibata R, Sato K, Pimentel D R, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms[J]. *Nat Med*, 2005, 11: 1096-1103.

[6] Harada M, Nattel S N, Nattel S. AMP-activated protein kinase: potential role in cardiac electrophysiology and arrhythmias[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012, 5: 860-867.

[7] Balsler J R. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 599-613.

[8] Kass R S. Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2006, 17(Suppl 1): S21-S25.

[9] Light P E, Wallace C H, Dyck J R. Constitutively active adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes[J]. *Circulation*, 2003, 107: 1962-1965.

[10] 张静, 郑兴, 秦永文, 周炳炎, 吴弘, 王洪如. 家族性传导系统异常伴心室预激及心肌肥厚一家系调查分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35: 258-259.

[本文编辑] 贾泽军