

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01165

PRKAG2 基因 G100S 新突变对心肌细胞钙稳态和糖原含量的影响

陈长源, 郑兴*, 秦永文, 徐荣良, 胡建强

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨首次在国人 WPW 综合征 (PRKAG2 心脏综合征) 家系中发现的一个新的错义突变 PRKAG2 G100S 引起心肌肥厚的可能机制。**方法** 使用 Invitrogen 的 Gateway™ 重组系统构建含有人全长 PRKAG2 基因新突变体 (PRKAG2 G100S) 的重组腺病毒载体; 以增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 为报告基因, 将病毒分别感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞和 SD 乳鼠心肌细胞后采用蛋白质印迹方法检测 PRKAG2 蛋白的表达。重组腺病毒感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 48 h 前后以 Rohd-2/AM 孵育并测定细胞内游离 Ca^{2+} 浓度; 感染乳鼠心肌细胞 48~72 h 后以过碘酸-雪夫 (PAS) 法测定细胞内糖原含量。**结果** 重组腺病毒分别感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞和 SD 乳鼠心肌细胞 48 h 后荧光显微镜下可观察到绿色荧光, 用 PRKAG2 单抗能检测到靶蛋白。与野生型 PRKAG2 和 EGFP 组比较, 重组腺病毒感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 48 h 后突变体 PRKAG2 G100S 组细胞内游离 Ca^{2+} 浓度无明显变化; 重组腺病毒感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 48 h 前后的细胞内游离 Ca^{2+} 浓度无明显变化。在重组腺病毒感染乳鼠心肌细胞 48 h 后, PRKAG2 G100S 组能检测到明显的心肌细胞内糖原累积。**结论** PRKAG2 G100S 新突变导致心肌肥厚的主要发病机制可能是细胞内糖原累积, Ca^{2+} 及其介导的细胞内信号转导途径可能未参与心肌肥厚的发生。

[关键词] PRKAG2 综合征; 基因; 突变; 钙; 糖原**[中图分类号]** R 541.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1165-04

Influence of PRKAG2 gene G100S novel mutation on glycogen storage and calcium homeostasis in cardiomyocytes

CHEN Chang-yuan, ZHENG Xing*, QIN Yong-wen, XU Rong-liang, HU Jian-qiang

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

[Abstract] **Objective** To investigate the possible mechanism by which PRKAG2 G100S, a novel mutation recently found in a Chinese family with Wolff-Parkinson-White (WPW) syndrome, induces cardiac hypertrophy. **Methods** The recombinant adenovirus containing human PRKAG2 G100S was constructed using Invitrogen's Gateway™ system and was used to infect rat embryonic H9c2 cardiomyocytes and cardiomyocytes of neonatal SD rats using EGFP as the reporter gene; Western blotting analysis was used to determine PRKAG2 protein expression. The intracellular free Ca^{2+} was determined in the H9c2 cells before and 48 h after infected with Ad-EGFP, Ad-PRKAG2 or Ad-PRKAG2 G100S by incubating with Rohd-2/AM. The glycogen contents in neonatal SD rat cardiomyocytes were determined by PAS 48-72 h after infection. **Results** Bright green fluorescence was observed in the cultured H9c2 cells and neonatal SD rat cardiomyocytes 48 h after infected with Ad-PRKAG2 G100S, and PRKAG2 protein expression was identified with PRKAG2 monoclonal antibody. Compared with wild-type PRKAG2 and EGFP groups, intercellular free Ca^{2+} concentration in H9c2 cells of Ad-PRKAG2 G100S group had no noticeable changes 48 h after infection, and the concentrations were not significantly different in Ad-PRKAG2 G100S group before and 48 h after infection. PAS revealed evident glycogen storage in the neonatal SD rat cardiomyocytes in PRKAG2 G100S group 48 h after infection. **Conclusion** Our findings indicate that myocardial glycogenesis might contribute to the pathogenesis of cardiac hypertrophy in patients with PRKAG2 G100S mutation, and the imbalance of calcium homeostasis in cardiomyocytes might not be involved in the pathogenesis.

[Key words] PRKAG2 syndrome; genes; mutation; calcium; glycogen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1165-1168]

PRKAG2 基因突变可导致产生一种特异的心脏综合征, 主要表现为家族性心室预激及快速性心律失常 (Wolff-Parkinson-White syndrome, WPW 综

合征), 进展性的传导系统病变及心肌肥厚, 这个综合征过去经常被诊断为肥厚性心肌病^[1]。在携带 PRKAG2 突变基因的患者中, 超过 80% 的患者存在

[收稿日期] 2010-05-05 **[接受日期]** 2010-11-05**[作者简介]** 陈长源, 博士生. E-mail: chenchangyuan.75@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870540, E-mail: zhengxing57530@163.com

心肌肥厚^[2];而且心肌肥厚通常是进展性的,患者逐渐出现左心功能不全及心脏肥大^[3-4]。然而,与编码肌小节蛋白的基因突变引起的典型肥厚性心脏病相比较,组织病理学检查发现 PRKAG2 突变患者心肌纤维排列紊乱罕见,心肌间质纤维化程度也很低^[5],表明 PRKAG2 突变导致心肌肥厚的发病机制与肥厚性心脏病可能并不相同。2002年,Gollob 等^[6]提出假说,认为 PRKAG2 基因突变导致产生一种异常的心脏糖原累积综合征并将其命名为 PRKAG2 心脏综合征。2007年^[7]我们发现了一个类似家族性肥厚性心脏病的家系,家系患者临床表现符合国外 PRKAG2 心脏综合征家系报道的共性;经全基因测序发现 PRKAG2 基因第 298 位碱基发生 G→A 的错义突变,导致翻译后的第 100 位甘氨酸(glycine, G)被丝氨酸(serine, S)取代。PRKAG2 G100S 是首次在国人 PRKAG2 心脏综合征家系中发现的新突变,国内外均未见报道。

细胞内 Ca^{2+} 是心肌细胞收缩的主要调节因子, Ca^{2+} 稳态的改变在心肌细胞机械收缩或电活动功能异常中均发挥重要作用,肥厚性心脏病和压力超负荷引起的心肌肥厚的发生及发展常伴随心肌细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡,胞质内 Ca^{2+} 浓度增加以及 Ca^{2+} 介导的细胞内信号转导途径激活^[8-9]。本研究拟通过已成功构建的含人 PRKAG2 G100S 及野生型 PRKAG2 cDNA 的重组腺病毒载体,分别感染体外培养的 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞及 SD 乳鼠心肌细胞,观察细胞内 Ca^{2+} 稳态以及糖原含量的变化,旨在探讨 PRKAG2 G100S 引起心肌肥厚的可能的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 突变体 PRKAG2 G100S 及以增强型绿色荧光蛋白(EGFP)为报告基因的野生型 PRKAG2 重组腺病毒由上海瑞赛生物公司构建;DMEM/F12 低糖培养基干粉(Gibco 公司,美国);优级胎牛血清(characterized FBS, Hyclon 公司,美国);H9c2 大鼠胚胎心肌细胞株(中国科学院上海生命科学院细胞资源中心); Ca^{2+} 荧光探针 RhoD-2 /AM (日本同仁化学研究所);过碘酸-雪夫(periodic acid-Schiff, PAS)糖原染色试剂盒(Genemed Scientifics 公司,美国); α_2 -肌动蛋白(actin)单克隆抗体(Sigma 公司,美国);青链霉素混合液(青霉素 100 IU/ml,链霉素 100 μ g/ml)、胰蛋白酶(0.25%)溶液、无水乙醇、丙酮(武汉博士德公司);PBS(pH 7.2, 0.01 mol/L)由国产分析纯试剂配制;流式细胞仪(BD Bioscience 公司,美国)。

1.2 乳鼠心肌细胞的培养 取 1~3 d 龄新生 SD 大鼠,摘下心脏,通过分步消化和差速贴壁的方法分

离纯化心室肌细胞,用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养;用抗横纹肌 α_2 -actin 抗体进行免疫荧光染色鉴定。

1.3 重组腺病毒感染 将生长状态良好的 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞及 SD 乳鼠心肌细胞分为实验(PRKAG2 G100S)组、阴性对照(PRKAG2)组和空白对照(EGFP)组,H9c2 胚胎心肌细胞按 5×10^5 /孔 每组分别接种于 6 孔板内(每组各设 3 个复孔,共 9 孔),乳鼠心肌细胞按 5×10^3 /孔接种于 24 孔板内(每组各设 2 个复孔,按 0、1、3、5d 感染,共 24 孔);H9c2 胚胎心肌细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM, 37℃, 5% CO_2 条件培养 4 d,每天加入 0.1 μ mol/L 全反式维 A 酸,24 h 换一次液;培养第 3 天用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养,以维持心肌细胞表型。在感染前 24 h 将细胞培养液更换成不含青链霉素混合液的 DMEM/F12 培养液,在上述 3 组细胞中分别加入 5~10 μ l 重组腺病毒 Ad-PRKAG2 G100S-EGFP、Ad-PRKAG2-EGFP 及 Ad-EGFP。

1.4 H9c2 胚胎心肌细胞内游离 Ca^{2+} 测定 去除长有 H9c2 胚胎心肌细胞的 6 孔板内的培养液,胰酶消化后转入离心管,加入 4 μ mol/L RhoD-2/AM 钙离子荧光探针负载细胞, CO_2 孵育箱中温孵 20 min,再加入含 1% 胎牛血清的 HBSS 液 3.5 ml, CO_2 孵育箱中温孵 40 min,弃 HBSS 液,用 HEPES 缓冲液漂洗 2~3 次,30 μ l HEPES 缓冲液重悬细胞,进行流式细胞分析。

1.5 乳鼠心肌细胞内糖原测定 采用 PAS 实验进行糖原染色,PAS 阳性反应产物表现为细胞质有紫红色球状颗粒。

1.6 统计学处理 以 SPSS 11.0 统计学分析软件处理数据,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个不同处理组间均数比较采用单因素方差分析,两均数间比较采用独立样本的 t 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞及 SD 乳鼠心肌细胞内重组蛋白的表达 重组腺病毒(Ad-PRKAG2 G100S-EGFP)分别感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞及 SD 乳鼠心肌细胞 48 h 后,荧光显微镜下观察到绿色荧光(图 1A、1B)。用抗 PRKAG2 单抗进行蛋白质印迹检测 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞及 SD 乳鼠心肌细胞内重组蛋白的表达情况,可见目的蛋白条带(图 1C、1D)。

2.2 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞内游离 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)含量 重组腺病毒感染 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 24~48 h 及 48~72 h 后,EGFP 组、野生型

PRKAG2 组和突变体 PRKAG2 组之间 $[Ca^{2+}]_i$ 差异均无统计学意义; 重组腺病毒感染 H9c2 心肌细胞 48 h 前后, 各组间 $[Ca^{2+}]_i$ 差异也均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

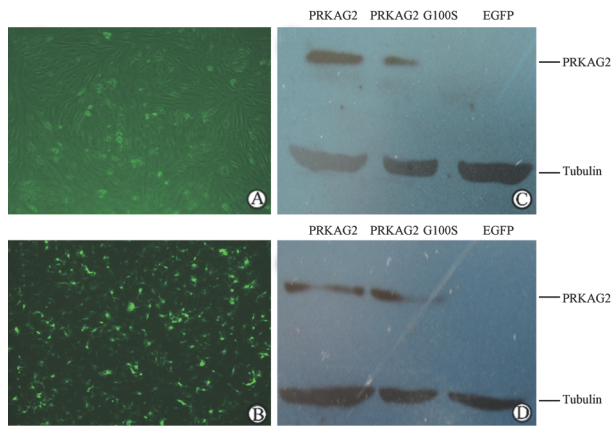


图 1 培养的 H9c2 心肌细胞及 SD 乳鼠心肌细胞重组蛋白过表达的鉴定

Fig 1 Identification of recombinant protein expression in cultured H9c2 cells and neonatal SD rat cardiomyocytes

A, B: Recombinant adenovirus infection of H9c2 cells and neonatal SD rat cardiomyocytes. C, D: Identification of recombinant protein expression with Western blotting analysis in H9c2 cells and neonatal SD rat cardiomyocytes. Original magnification: $\times 10$ (A, B)

表 1 腺病毒感染 H9c2 胚胎心肌细胞 48 h 前后 Rohd-2 相对值

Tab 1 Rohd-2 ratio of H9c2 cells before and 48 h after transfected with Ad-EGFP, Ad-PRKAG2 and Ad-PRKAG2 G100S

Group	Time after infection <i>t</i> /h	
	24-48	48-72
EGFP	12.72 \pm 7.68	24.18 \pm 2.43
PRKAG2	17.28 \pm 7.79	26.24 \pm 4.77
PRKAG2 G100S	19.33 \pm 5.50	26.04 \pm 5.71

2.3 SD 乳鼠心肌细胞糖原表达 重组腺病毒感染乳鼠心肌细胞后第 3 天, PAS 法测定实验组乳鼠心肌细胞内有明显的糖原累积。与对照组比较(图 2A), 实验组细胞 PAS 反应检测结果显示, 紫红色糖原沉积区域增大, 出现紫红色区域的细胞增多(图 2C)。感染后第 5 天与第 3 天相比较, 各组糖原累积结果无明显变化(资料未显示)。

3 讨论

PRKAG2 突变经常导致患者出现心肌肥厚和猝死。PRKAG2 是 AMPK $\gamma 2$ 调节亚基的编码基因。AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 由 α 、 β 、 γ 亚基组成异质三联体, 在细胞中发挥代谢感受器的功

能, 监测细胞内的 AMP /ATP 比值, 在缺氧、缺血、运动等应激状态下, AMP 浓度升高, AMPK 激活, 一方面关闭消耗 ATP 的合成代谢途径; 另一方面启动产生 ATP 的分解代谢途径, 在心肌物质代谢和能量平衡的调节过程中发挥关键作用^[10-11]。PRKAG2 突变导致心肌肥厚的致病机制, 有研究认为是由于 AMPK 基础活性异常增高, 心肌细胞摄取葡萄糖增加, 但对葡萄糖利用不足, 心肌能量代谢障碍, 导致心肌细胞内糖原累积, 糖原和细胞内高渗状态下水分聚集引起心肌细胞肥大^[12]。但是, Banerjee 等^[13]研究发现, PRKAG2 T400N 突变导致增加的心肌重量, 只有 4% 左右能用糖原累积解释^[14]。因此, 糖原累积并不能完全说明心肌肥厚的发生机制。由于 AMPK 不但是一个“细胞能量的调节器”, 同时还调节多种编码细胞因子的基因转录, 影响细胞内许多细胞因子的表达^[15], 提示可能有 AMPK 相关的细胞内信号通路参与心肌重塑过程。

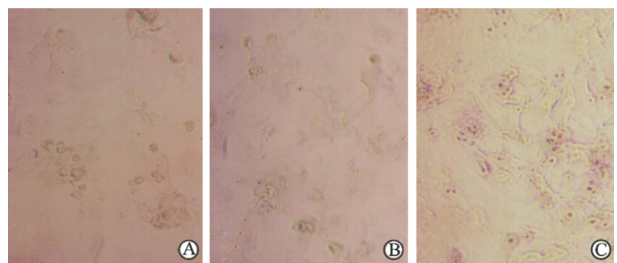


图 2 培养的 SD 乳鼠心肌细胞内糖原含量的鉴定
Fig 2 Identification of intracellular glycogen with PAS staining in cultured neonatal SD rat cardiomyocytes

A: Blank group; B: Negative control group; C: PRKAG2 G100S group. PAS staining showed great intracellular glycogen accumulation. Original magnification: $\times 40$

$[Ca^{2+}]_i$ 升高是心肌肥厚信号转导发生、发展的中心环节。当心肌细胞受到机械牵张或心脏负荷增加时, 心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度出现反应性增加, 多种能引起心肌肥大的体液因子如: 血管紧张素 II、苯肾上腺素、内皮素-1 等, 进一步使心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增加。心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 持续增高会损害心脏的舒张功能, 导致心脏舒张功能障碍; 而且心肌细胞质内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高可激活细胞内一系列依赖 Ca^{2+} 的 ATP 酶, 使 ATP 降解增加, 不仅使肌球蛋白和肌动蛋白脱耦联受到抑制, 而且使肌浆网和质膜的 Ca^{2+} 转运受损, 进一步使胞质内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 形成恶性循环, 导致 Ca^{2+} 超载。 Ca^{2+} 超载可启动 Ca^{2+} 介导的信号转导途径参与心肌肥厚的发生和发展。

Evans 等^[16] 研究发现, 缺氧可以激活 AMPK, 通过 cADP 受体途径诱导肺动脉平滑肌细胞雷尼丁

(ryanodine,RY)敏感的内质网(sarcoplasmic reticulum,SR)储存钙释放进入胞质,引起肺动脉收缩;还可通过诱导颈动脉体球细胞外的 Ca^{2+} 跨膜内流,引起颈动脉体兴奋;Evans 等同时应用 AMPK 激动剂——AICAR,在肺动脉平滑肌细胞及颈动脉体球细胞中得到了相同的结果,表明缺氧可以通过激活 AMPK 来调节氧敏感细胞的 Ca^{2+} 信号转导。体外细胞转染及转基因动物实验均表明^[17-18],PRKAG2 突变使 AMPK 的基础活性异常增加,因此我们提出假说:PRKAG2 G100S 可能导致心肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高。

在本研究中,PRKAG2 G100S 实验组与野生型 PRKAG2 阴性对照组及 EGFP 空白对照组间以及 PRKAG2 蛋白表达高峰(48~72 h)前后,均未能检测到 H9c2 大鼠胚胎心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 发生明显异常变化,表明 PRKAG2 G100S 未能引起心肌细胞内钙稳态失衡,可能 PRKAG2 G100S 引起心肌肥厚的分子发病机制与钙稳态失衡及 Ca^{2+} 介导的细胞内信号转导途径无关。同时,PRKAG2 G100S 未能影响心肌细胞的钙稳态,也表明细胞能量代谢障碍可能对钙稳态的影响较小。

本研究首次在体外培养的 PKRAG2 G100S 重组腺病毒感染后的乳鼠心肌细胞内发现了糖原累积,表明 PRKAG2 G100S 可能导致一种心脏糖原累积综合征,其导致心肌肥厚的发病机制可能主要与心肌细胞内糖原累积有关。本研究为 Gollob 等^[6]提出的假说:PRKAG2 心脏综合征是能量代谢障碍导致的心脏特异的糖原累积综合征进一步提供了支持依据。体外细胞实验由于心肌细胞存活时间较短及缺乏体内特殊的生理环境,有其研究局限性,利用转基因动物研究 PRKAG2 G100S 对心肌细胞能量代谢和细胞内信号转导途径的影响应该是下一步的研究重点。

[参考文献]

[1] Ahmad F, Arad M, Musi N, He H, Wolf C, Branco D, et al. Increased alpha2 subunit-associated AMPK activity and PRKAG2 cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2005, 112: 3140-3148.

[2] Bayrak F, Komurcu-Bayrak E, Mutlu B, Kahveci G, Basaran Y, Erqinel-Unaltuna N. Ventricular pre-excitation and cardiac hypertrophy mimicking hypertrophic cardiomyopathy in a Turkish family with a novel PRKAG2 mutation[J]. *Eur J Heart Fail*, 2006, 8: 712-715.

[3] Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Karr B, et al. Mutations in the gamma (2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 1215-1220.

[4] Murphy R T, Mogensen J, McGarry K, Bahl A, Evans A, Osman E, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase

disease mimicks hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome: natural history[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 922-930.

[5] Arad M, Seidman J G, Seidman C E. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 2499-2506.

[6] Gollob M H, Green M S, Tang A S, Roberts R. PRKAG2 cardiac syndrome: familial ventricular preexcitation, conduction system disease, and cardiac hypertrophy [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2002, 17: 229-234

[7] 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-家系调查分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35: 258-259.

[8] Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2004, 109: 1284-1291.

[9] Alves M L, Gaffin R D, Wolska B M. Rescue of familial cardiomyopathies by modifications at the level of sarcomere and Ca^{2+} fluxes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48: 834-842.

[10] Charron P, Genest M, Richard P, Komajda M, Pochmalicki G. A familial form of conduction defect related to a mutation in the PRKAG2 gene [J]. *Europace*, 2007, 9: 597-600.

[11] Kemp B E, Mitchelhill K I, Stapleton D, Michell B J, Chen Z P, Witters L A. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase [J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24: 22-25.

[12] Gollob M H. Glycogen storage disease as a unifying mechanism of disease in the PRKAG2 cardiac syndrome [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31: 228-231.

[13] Banerjee S K, McGaffin K R, Huang X N, Ahmad F. Activation of cardiac hypertrophic signaling pathways in a transgenic mouse with the human PRKAG2 Thr400Asn mutation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802: 284-291.

[14] Arad M, Benson D W, Perez-Atayde A R, McKenna W J, Sparks E A, Kanter R J, et al. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 357-362.

[15] 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.

[16] Evans A M, Mustard K J, Wyatt C N, Peers C, Dipp M, Kumar P, et al. Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O2-sensing cells [J]? *J Biol Chem*, 2005, 280: 41504-11.

[17] Arad M, Benson D W, Perez-Atayde A R, McKenna W J, Sparks E A, Kanter R J, et al. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 357-362.

[18] Banerjee S K, Ramani R, Saba S, Rager J, Tian R, Mathier M A, et al. A PRKAG2 mutation causes biphasic changes in myocardial AMPK activity and does not protect against ischemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360: 381-387.