

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.01.0034

人 *PRKAG2* (R302Q) 突变型 SD 乳鼠心肌细胞模型的建立及检测

陈 挺, 刘 杰, 于云华, 鲍礼智, 康 波, 郑 兴*

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 包装人 *PRKAG2*(R302Q)突变型的腺病毒后感染原代 SD 乳鼠心肌细胞, 构建细胞模型。 **方法** 首先通过 BP 及 LR 重组获得人 *PRKAG2*(R302Q)突变型的腺病毒表达载体, 将其线性化转染 293 细胞进行腺病毒包装和扩增。收集纯化腺病毒液感染原代 SD 乳鼠心肌细胞后进行蛋白质印迹法检测。 **结果** *PRKAG2*(R302Q)突变型的腺病毒载体经测序验证插入序列正确, 腺病毒感染乳鼠心肌细胞后蛋白质印迹法检测其过表达明显 ($P < 0.05$)。 **结论** 包装人 *PRKAG2* (R302Q) 突变型基因的腺病毒并成功感染 SD 乳鼠心肌细胞, 为进一步研究基因 *PRKAG2*(R302Q) 突变体的功能奠定了基础。

[关键词] *PRKAG2* 基因; 突变; 腺病毒包装; 心肌细胞模型

[中图分类号] R 541 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)01-0034-06

Establishment and confirmation of neonatal rat cardiomyocyte model over-expressing mutant human *PRKAG2*

CHEN Ting, LIU Jie, YU Yun-hua, BAO Li-zhi, KANG Bo, ZHENG Xing*

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

[Abstract] **Objective** To establish a cardiomyocyte model over-expressing mutant human *PRKAG2* by infecting neonatal SD rat myocardial cells with constructed recombinant adenovirus vector Ad-*PRKAG2* (R302Q)-IRES2-EGFP. **Methods** *PRKAG2* (R302Q)-IRES2-EGFP was directly cloned into entry vector pDONR221 by using Invitrogen Gateway™ technology. Then BP and LR recombination reactions yielded the recombinant adenovirus vector containing human *PRKAG2* (R302Q) gene. The pAd-*PRKAG2* (R302Q)-IRES2-EGFP was digested by *Pac* I, and transfected into 293 cells. After packaging, amplification and purification, the virus was used to infect neonatal rat cardiomyocytes. Then the expression of *PRKAG2* protein was assayed by Western blotting analysis in the infected neonatal SD rat cardiomyocytes. **Results** Restriction enzyme digestion analysis and the sequence analysis confirmed that *PRKAG2*(R302Q) gene was successfully inserted into the adenovirus vector. The myocardial cells infected with Ad-*PRKAG2*(R302Q)-IRES2-EGFP gave off strikingly bright green fluorescence and *PRKAG2* protein was proven significantly over-expressed by Western blotting analysis ($P < 0.05$). **Conclusion** The recombinant adenovirus containing human *PRKAG2*(R302Q) gene has been successfully constructed and expressed in neonatal rat cardiomyocytes, which paves a way for further study of *PRKAG2* (R302Q) gene mutation.

[Key words] *PRKAG2* gene; mutation; adenovirus package; myocardial cell model

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(1): 34-39]

PRKAG2 心脏综合征是一种罕见的常染色体显性遗传病, 是由于编码单磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) $\gamma 2$ 亚基的 *PRKAG2* 基因遗传性缺陷, 从而导致不同临床表现度的多种心脏表型, 典型表现为心室预激、进展性传导系统疾病和心脏肥大^[1]。目前研究认为, *PRKAG2* 心脏综合征是一种由于 AMPK 活性紊乱

导致糖原沉积的心脏代谢性疾病^[2]。本研究通过包装人 *PRKAG2*(R302Q)突变型的腺病毒并感染乳鼠心肌细胞, 为进一步研究基因 *PRKAG2*(R302Q) 突变的功能以及 *PRKAG2* 心脏综合征的发病机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 293 细胞由本实验室自行

[收稿日期] 2015-10-11 **[接受日期]** 2015-12-07

[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] 陈 挺, 博士. E-mail: pipidan@126.com

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

保存, 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室自行制备, 突变型人 PRKAG2(R302Q) 的真核表达载体 pPRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 由笔者自行构建; 腺病毒重组及表达质粒 pDNOR221 和 pAD/CMV/V5-DEST (Invitrogen 公司); plentimum pfx 聚合酶、重组酶、脂质体 lipo2000 (Invitrogen 公司); Taq 聚合酶 [生工生物工程(上海)股份有限公司]; 限制性内切酶 Pac I (NEB 公司); 普通质粒小抽试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 PCR 清洁试剂盒 (Axygen 公司); TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司); 反转录酶 (Promega 公司), DMEM 培养基及血清 (Gibco 公司), 链霉素/青霉素 (Sigma 公司), PRKAG2 抗体 (Abcam 公司)。

1.2 BP 重组引物设计与合成 设计含重组位点的 BP 重组引物。上游引物: F1, 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGC CAC CAT GGG AAG CGC GGT TAT GG-3'; 下游引物: R1, 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC -3'。以上引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 PRKAG2 (R302Q) 突变型腺病毒载体的 BP 重组及鉴定 以 PRKAG2 (R302Q) 突变型的真核表达载体 pPRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 为模板, 采用 BP 重组引物 F1/R1 扩增目标序列。PCR 体系如下: 模板质粒 0.5 μ L, 10 μ mol/L 的 F1 和 R1 引物各 2 μ L, plentimum pfx 聚合酶 0.2 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 50 mmol/L MgSO₄ 1 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 无菌双蒸水加至 50 μ L。反应体系在冰上配制, 混匀, 瞬时离心后置 PCR 仪, 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 180 s, 进行 30 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 并用 Axygen 胶回收试剂盒回收目的片段。

使用 Invitrogen 的 BP 重组系统将扩增得到的目的片段 PRKAG2 (R302Q)-IRES-EGFP 重组到中间载体 pDONR221 上, BP 重组反应体系: BP 重组 PCR 产物 2 μ L, pDONR221 vector 1 μ L, BP clonase II enzyme mix 2 μ L, 无菌双蒸水加至 10 μ L, 25 $^{\circ}$ C 反应过夜后加入 1 μ L 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min。

取 5.0 μ L 重组反应液转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。次日挑取单菌落, 置于 20 μ L 无菌水中溶解, 取 1 μ L 菌液作为模板, F1/R1 为引物进行菌落 PCR, PCR 体系如下: 模板 1 μ L, 10 μ mol/L 的 F1 和 R1 引物各 2 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 \times Buffer 1.5 μ L, 无菌双蒸水加至 15 μ L。反应体系在冰上配制, 混匀, 瞬时离心后置 PCR 仪, 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 180 s, 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 鉴定呈阳性的克隆接到 LB 培养液中, 摇菌过夜, 次日抽提质粒送测。

1.4 突变型 PRKAG2 (R302Q) 腺病毒载体的 LR 重组及鉴定 使用 Invitrogen 的 LR 重组系统将 pDONR221-R302Q-IRES-EGFP 中间载体上携带的目的片段重组到腺病毒载体 pAd/CMV/V5-DEST, LR 重组反应体系: pDONR221-R302Q-IRES-EGFP 质粒 1 μ L, pAd/CMV/V5-DEST 质粒 1 μ L, LR clonase II enzyme mix 2 μ L, 无菌双蒸水加至 10 μ L。25 $^{\circ}$ C 反应过夜后加入 1 μ L 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min。

取 5.0 μ L 重组反应液转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。次日, 挑取单菌落, 置于 20 μ L 无菌水中溶解, 取 1 μ L 菌液作为模板, F1/R1 为引物进行菌落 PCR, PCR 体系如下: 模板 1 μ L, 10 μ mol/L 的 F1 和 R1 引物各 2 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 \times Buffer 1.5 μ L, 无菌双蒸水加至 15 μ L。反应体系在冰上配制, 混匀, 瞬时离心后置 PCR 仪, 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 180 s, 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 鉴定呈阳性的克隆接到 LB 培养液中, 摇菌过夜, 次日抽提质粒送测。

1.5 突变型 PRKAG2 (R302Q) 腺病毒包装、扩增及检测 将 5×10^5 的 293 细胞接种至 6 孔板, 培养条件为 DMEM + 10% 胎牛血清 (FBS) + 1% 链霉素/青霉素, 5% CO₂、95% 湿润空气、37 $^{\circ}$ C 培养。第 2 天细胞融合度约 50%。Pac I 酶将 pAD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 质粒线性化后, 采用脂质体 lipo2000 转染 293 细胞。转染 8 h 后, 换新鲜完全培养液继续培养, 48 h 后观察细胞状态,

用胰酶消化细胞传至 10 cm 细胞培养板,每 2 d 换新鲜培养液,7 d 可看到明显的病毒斑出现。

至大量细胞崩解脱落,将细胞培养上清及细胞碎片收集于离心管中放于超低温冰箱冷冻,2 h 后取出至 37℃ 融解,如此反复冻融两次裂解细胞。将反复冻融的病毒液 1 500 × g 离心 15 min 后,每 100 μL 感染 10 cm 皿 293 细胞 1 皿,共计感染 25 皿,将初始得到的腺病毒继续扩增,至细胞崩解后收集病毒液过滤,于 4℃ 50 000 × g 离心 2 h,浓缩液按照 50 μL 小量分装保存于超低温冰箱。

采用 TCID₅₀ 法检测病毒滴度,将浓缩获得的病毒液梯度稀释至 10⁻⁶ ~ 10⁻¹³ 共 8 个梯度,准备 96 孔板 293 细胞一板,每个梯度稀释 10 孔细胞,培养 8 d 后观察细胞病变率,计算病毒滴度。

1.6 原代 SD 乳鼠心肌细胞的分离和培养 用 75% 乙醇对乳鼠[SCXK(沪) 2007-0003]胸部消毒 2 次,用 1 把无菌剪刀剪开左侧胸部皮肤,用第 2 把无菌剪刀剪开胸腔并剪断动脉等,取出心脏并去除心室以外的心脏组织,低温条件下用 D-Hank's 液清洗 3 遍,以去除血凝块等杂质。将心肌剪碎为约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块,加入预先配好的 6 mL 消化液,混匀,将液体及组织块转入锥形瓶,置入 37℃ 水浴摇床中消化 4 min,用无菌塑料吸管轻轻吹打 1 min,转入离心管,离心 1 min(70 × g);弃上清液,沉淀的组织中加入 6 mL 消化液再次 37℃ 水浴消化 6 min,轻轻吹打,离心 1 min(70 × g);收集上清液(含心肌细胞),沉淀的心肌组织继续进行消化。如此反复 5 次,分别收集含有心肌细胞的上清液,每次收集的上清液中加入 1 mL FBS 终止消化,离心 6 min(300 × g),弃上清,试管底部沉淀即为实验所需的 SD 乳鼠心肌细胞。

用 DMEM/F12 + 10% FBS + 双抗配制的培养液将非心肌细胞的杂物用重悬的方法沉淀,吸取上层细胞悬液(为心肌细胞),将其转入细胞培养皿,置入细胞培养箱(5% CO₂、37℃)进行培养。收集 5 次消化后的重悬液体,用 200 目筛网过滤,除去未消化完的组织块,将过滤的液体移入培养瓶,培养 1.5 h,利用差速贴壁的方法将心肌细胞和成纤维细胞分离。将上层的液体(含心肌细胞)吸出,放于试管中(等待种植),用细胞计数板计算细胞数量,调整心肌细胞的密度为 5 × 10⁵ / mL,将其种植于 6 孔板中,48

h 后更换培养液,其后每 24 小时更换培养液 1 次,至第 72 小时,心肌细胞连接成片、同步化有序波动后,可进行腺病毒感染。

1.7 PRKAG2 (R302Q) 突变型腺病毒感染 SD 乳鼠心肌细胞后的蛋白质印迹法检测 将 PRKAG2 (R302Q) 突变型及阴性对照腺病毒按照感染复数(MOI)为 20 感染 6 孔板 5.0 × 10⁵ / mL 密度乳鼠心肌细胞,培养条件为 DMEM/F12 + 10% FBS + 1% 链霉素/青霉素、5% CO₂、95% 湿润空气、37℃。并于 72 h 收样,经蛋白裂解及定量,取 20 μg 上样电泳,电转 PVDF 膜后进行蛋白质印迹法检测。5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,PRKAG2 兔多抗按稀释比 1 : 250 于 4℃ 孵育过夜;PBST 洗膜 5 min;羊抗兔二抗稀释比 1 : 5 000 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 5 min × 4 次,与增强化学发光试剂(ECL)反应 2 min, X 线胶片压片曝光 1 min。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 14.0 统计软件对实验数据进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 人突变型基因 PRKAG2 (R302Q) 的 BP 重组鉴定 经 BP 重组扩增得到的阳性片段 PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 与中间载体 pDONR221 进行 BP 重组,将重组反应液转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,进行菌落 PCR 鉴定,结果如图 1,阳性克隆送测结果经比对与原序列完全一致。

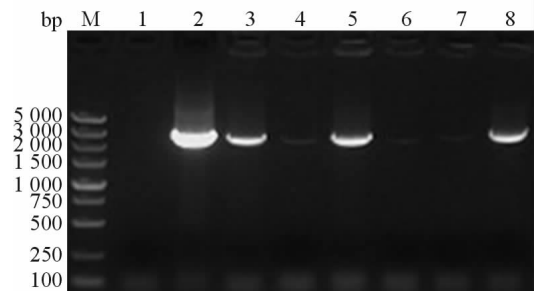


图 1 中间载体 pDONR221-PRKAG2 (R302Q)-IRES-EGFP 的 PCR 鉴定

Fig 1 Colony PCR verification of pDONR221-PRKAG2[R302Q]-IRES-EGFP

M: DNA marker; 1: Negative control (ddH₂O as template); 2: Positive control, pPRKAG2(R302Q)-IRES2-EGFP as template; 3-8: Six clones, lane 3, 5, and 8 are positive clones

2.2 腺病毒载体 pAD-R302Q-IRES2-EGFP 的 PCR 鉴定 LR 重组系统将 pDONR221-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 中间载体上携带的目的片段重组到腺病毒载体 pAd/CMV/V5-DEST, 将重组反应液转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 2, 阳性克隆送测结果经比对与原序列完全一致。

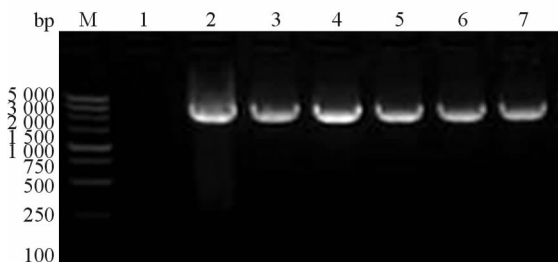


图 2 腺病毒载体 pAD-PRKAG2(R302Q)-IRES2-EGFP 的菌落 PCR 鉴定

Fig 2 Colony PCR verification of pAD-PRKAG2 (R302Q) -IRES2-EGFP

M; DNA marker; 1; Negative control (ddH₂O as template); 2; Positive control, pPRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP as template; 3-7; All of five clones are positive clones

2.3 原代 SD 乳鼠心肌细胞的培养 12 h 时细胞多数贴于培养皿上, 仅仅少数心肌细胞有偶尔跳动。48 h 后观察细胞, 其互相融合接触形成网格形状(图 3A), 跳动增强, 搏动有力。96 h 后观察, 整片培养皿的细胞融成一片(图 3B), 跳动速率 80~100 次/min。

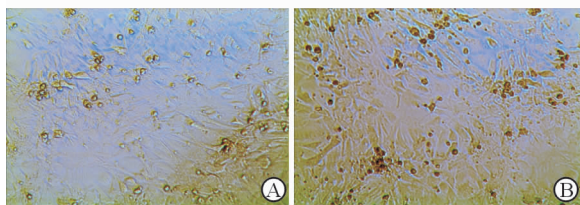


图 3 乳鼠心肌细胞的原代分离培养

Fig 3 Culture of the neonatal rat cardiomyocytes

A: 48 h; B: 96 h. Original magnification; $\times 100$

2.4 AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 腺病毒包装及感染 SD 乳鼠心肌细胞结果 经检测 AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 腺病毒的滴度为 6.5×10^{11} IU/mL。按照 MOI=30 感染 SD 乳鼠心肌细胞感染率可达到 80% 以上, 白光及荧光照片见图 4。

2.5 AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 腺病毒感染 SD 乳鼠心肌细胞蛋白质印迹法检测结果 检

测发现, AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 腺病毒感染组相对乳鼠心肌细胞和阴性对照病毒感染组, PRKAG2 表达量增高 (腺病毒感染组: 1.52 ± 0.04 , 乳鼠心肌细胞: 1.08 ± 0.08 , 阴性对照组: 1.13 ± 0.02), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

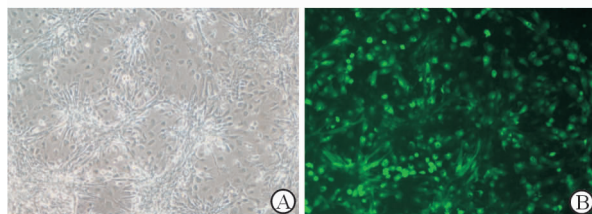


图 4 腺病毒 AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 感染乳鼠心肌细胞

Fig 4 Neonatal rat cardiomyocytes infection with AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP

A: White light; B: Fluorescence. Original magnification; $\times 100$

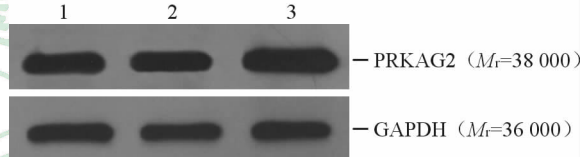


图 5 腺病毒 AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP 感染乳鼠心肌细胞的蛋白质印迹法检测

Fig 5 Western blotting analysis verifying AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP infection of neonatal rat cardiomyocytes

1; Neonatal rat cardiomyocytes as blank control; 2; Neonatal rat cardiomyocytes infected with AD-EGFP as negative control; 3; Neonatal rat cardiomyocytes infected with AD-PRKAG2 (R302Q)-IRES2-EGFP

3 讨论

PRKAG2 基因是 AMPK $\gamma 2$ 亚基的编码基因, 其突变可使 AMPK 活性紊乱, 导致糖原沉积的心脏代谢性疾病, 调节 AMPK 活性可使心脏获益^[3]。Cheung 等^[4] 首先确定并克隆了 PRKAG2 的 cDNA, 该基因包括 16 个外显子并且至少包含 30 万个碱基。另一种不同转录起始于第 4 个内含子, 其转录产物与外显子 5~16 相对应, 转录产物的全长及截短部分则分别代表了 PRKAG2a 及 PRKAG2b, 它们均在心脏组织高度表达^[5-6]。5 个错义突变及 1 个移码突变已经在 PRKAG2 的密码序列中被发现, 在 7 个家系的研究中发现最常见的

突变是 302 位的精氨酸被谷胺酰胺所代替 (R302Q), 不同的临床表现可能与特异性的突变相对应^[7]。另外 Mohun 等^[8]研究发现, 钠/葡萄糖协同转运蛋白 1 (SGLT1) 在糖原累积过程中也会升高, 将其敲低可减弱 PRKAG2 心脏综合征症状, 其作用仅次于 PRKAG2 突变。

PRKAG2 心脏综合征的患者均被证实有 PRKAG2 基因突变。迄今为止, 已发现的突变已有数十种之多, 不排除在后续的研究中发现新的突变。所有这些突变都是形成 PRKAG2 心脏综合征的重要因素, 所以对于这些基因突变进行研究, 进而阐述其发病机制及药物靶点显得尤为重要。

本实验室前期研究发现, 突变位点 G100S 区别于之前发现的所有突变位点, 位于非 CBS 区域, 对 G100S 突变进行体外细胞功能研究, 明确了这一突变位点在汉族人 PRKAG2 心脏综合征家系心律失常发病中的作用通路^[9]。Michael 等^[10]在过表达 PRKAG2(N488I) 突变的转基因鼠上发现了与具有该突变的人相似的心肌病和电生理表型。Kim 等^[11]则在 PRKAG2(N488I) 突变的转基因鼠上发现不依赖于糖原累积的心肌疾病, 即 PRKAG2 基因突变的疾病新机制。Banerjee 等^[12]构建了 PRKAG2 (T400N) 突变的转基因鼠模型, 观察到过度的糖原沉积、心脏肥大、预激等表型, 同时他们发现 PRKAG2(T400N) 转基因鼠的心脏 AMPK 活性存在双相变化, 早期激活, 随后受到抑制, 最后又恢复到野生型水平。

针对 PRKAG2(R302Q) 突变位点, Sidhu 等^[13]成功构建了 PRKAG2(R302Q) 突变型小鼠, 该转基因小鼠表现出与人类相似的家系型 WPW 预激综合征, 为心脏传导系统和通路的研究提供了基础。Tan 等^[14]研究发现了 PRKAG2(R302Q) 预激综合征与马海姆纤维之间的联系, 这些发现支持了 PRKAG2 可能参与心脏传导系统的新观点。刘湘玮等^[15]发现, PRKAG2 基因 R302Q 突变导致同胞兄弟出现不同的临床表现, 即使在同一家系中 R302Q 突变也会引起 PRKAG2 心脏综合征, 显示其具有显著的异质性。最新研究中, 张亚平等^[16]利用 PRKAG2(R302Q) 腺病毒感染 H9C2 大鼠心肌细胞, 发现 R302Q 突变导致心肌细胞内糖原贮积, 而钙离子稳态并未受到影响, 无钙超载现象发生。

Pu 等^[17]通过全外显子测序和 PCR 测序确认, 一个中国疾病家系的突变位点为 PRKAG2(R302Q), 此突变位点与心肌肥大和 WPW 预激综合征有关, 该项工作为探索心肌肥大的原因以及临床诊断和预后评估提供了理论基础。

本研究选取突变型 PRKAG2(R302Q) 作为研究对象, 包装可表达突变型 PRKAG2(R302Q) 的腺病毒, 将其感染乳鼠心肌细胞后, 经蛋白质印迹法检测, 发现突变型 PRKAG2(R302Q) 过表达明显, 从而为进一步的细胞水平研究以及后续的动物水平研究提供了良好的工作基础。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] Gollob M H. Glycogen storage disease as a unifying mechanism of disease in the PRKAG2 cardiac syndrome [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(Pt 1): 228-231.
- [3] 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.
- [4] Cheung P C, Salt I P, Davies S P, Hardie D G, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding[J]. *Biochem J*, 2000, 346(Pt 3): 659-669.
- [5] Gollob M H, Seger J J, Gollob T N, Tapscott T, Gonzales O, Bachinski L, et al. Novel PRKAG2 mutation in the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction defects with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2001, 104: 3030-3033.
- [6] Lang T, Yh L, Tu Q, Jiang J, Chen Z, Xin Y, et al. Molecular cloning, genomic organization, and mapping of PRKAG2, a heart abundant gamma2 subunit of 5'-AMP-activated prorelin kinase, to human chromosome 7q36[J]. *Genomics*, 2000, 70: 258-263.
- [7] 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.
- [8] Mohun R, Sharma R K, Stephen D, So Jung L, David D, Huang X Y, et al. Transgenic knockdown of cardiac sodium/glucose cotransporter 1 (SGLT1) attenuates *PRKAG2* cardiomyopathy, whereas transgenic overexpression of cardiac SGLT1 causes pathologic hypertrophy and dysfunction in mice[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3: 845-847.
- [9] Zhang B L, Xu R L, Zhang J, Zhao X X, Wu H, Ma L P, et al. Identification and functional analysis of a novel *PRKAG2* mutation responsible for Chinese *PRKAG2* cardiac syndrome reveal an important role of non-CBS domains in regulating the AMPK pathway [J]. J Cardiol, 2013, 62: 241-248.
- [10] Michael A, Moskowitz I P, Patel V V, Ahmad F, Ferhaan A, Sawyer D B, et al. Transgenic mice overexpressing mutant *PRKAG2* define the cause of Wolff-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy[J]. Circulation, 2003, 107: 2850-2856.
- [11] Kim M, Hunter R W, Garcia-Menendez L, Gong G, Yang Y Y, Kolwicz S C Jr, et al. Mutation in the γ 2-subunit of AMP-activated protein kinase stimulates cardiomyocyte proliferation and hypertrophy independent of glycogen storage[J]. Circ Res, 2014, 114: 966-975.
- [12] 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.
- [13] Sidhu J S, Rajawat Y S, Rami T G, Gollob M H, Wang Z, Yuan R, et al. Transgenic mouse model of ventricular preexcitation and atrioventricular reentrant tachycardia induced by an AMP-activated protein kinase loss-of-function mutation responsible for Wolff-Parkinson-White syndrome [J]. Circulation, 2005, 111: 21-29.
- [14] Tan H L, van der Wal A C, Campian M E, Kruyswijk H H, Bram T H J, van Doorn D J, et al. Nodoventricular accessory pathways in *PRKAG2*-dependent familial preexcitation syndrome reveal a disorder in cardiac development [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2008, 1: 276-281.
- [15] 刘湘玮, 王聪, 孙爱军, 王鹏, 管丽华, 程蕾蕾, 等. *PRKAG2* 基因 R302Q 突变致同胞兄弟不同临床表现的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2013, 2: 486-488.
- [16] 张亚平, 颜彦, 宋振举, 童朝阳. *PRKAG2* 心脏综合征中 R302Q 突变对心肌细胞糖原和钙离子稳态的影响[J]. 中国临床医学, 2015, 4: 479-481.
- [17] Pu T, Guo Q, Cao R, Xu R, Sun K, Chen S. Using exome sequencing to identify the cause of myocardial hypertrophy in a Chinese family[J]. Mol Med Rep, 2015, 12: 3662-3666.

[本文编辑] 尹茶