

大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道的基因克隆及分布分析*

任成涛¹⁾ 欧绍武^{1)**} 王运杰¹⁾ 林 毅¹⁾ 宗志红²⁾

(¹⁾中国医科大学附属第一医院神经外科, 沈阳 110001; ²⁾中国医科大学生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001)

摘要 为了阐明大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的编码基因、分子特性及其在不同发育阶段各脑叶的分布差异, 应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法, 对大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位进行了克隆 (命名为 rN1), 并比较其不同发育阶段各脑叶的分布情况. rN1 基因编码 2 016 个氨基酸残基, 序列分析显示, 其与 rH1 氨基酸相似性为 96.53%, 与 hNbR1 相似性为 96.13%. 在 DI-S3~S4 发现与 rH1 不同的一个新的外显子 (第 7 外显子), 同时发现 D II~III 选择性剪切了第 20 外显子 (53 个氨基酸残基) 的异构体 (命名为 rN1-2). 分布结果显示, 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位在不同发育阶段各脑叶分布有明显的差异, 研究证实, Nav1.5 钠通道在大鼠脑组织显著表达, 存在脑叶的分布差异, 而且随着脑组织的发育, 其表达逐渐趋于稳定, 实验证实 Nav1.5 钠通道基因编码了一个新的外显子而且其表达范围更加广泛.

关键词 大鼠, 钠通道, 基因克隆, 分布, 脑组织

学科分类号 Q71

电压 - 门控性钠通道 (voltage-gated sodium channel, VGSC) 是可兴奋细胞动作电位初期调节钠离子通透性的一种跨膜蛋白, 它具有电压依赖性激活、迅速失活和选择性离子传导等 3 个特性. 目前已经明确, 哺乳动物电压 - 门控性钠通道包含众多的亚家族, 这些蛋白质由一个 α 亚单位和 β_1 、 β_2 、 β_3 、 β_4 4 个不同的 β 亚单位组成^[1,2], 其中 α 亚单位可单独发挥生理作用, β 亚单位只起辅助和调节作用, 目前已有 Nav1.1~Nav1.9 等钠通道亚家族 α 亚单位的基因被成功克隆并根据统一命名法命名^[3]. Nav1.5 钠通道为河豚毒抵抗型, 曾被认为是心肌的主要离子通道, 近年来也被发现在神经母细胞瘤细胞和脑组织中高度表达^[4,5].

Nav1.5 钠通道在神经母细胞瘤细胞 (NB-1) 中已被成功克隆^[3], 但是脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位氨基酸序列如何, 与心肌是否有同源性, 在大鼠脑组织中不同发育阶段各脑叶的分布如何等均未见报道, 因此, 我们克隆了大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位并检测不同发育阶段其在各脑叶的分布.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雄性 Wistar 大鼠购自辽宁省动物实验中心,

RNAOUT 试剂盒购自天泽基因工程有限公司, RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司. DNA 纯化试剂盒、pGEM-TEasy 克隆载体、T4 连接酶、感受态细胞、质粒提取试剂盒购自 Pharmacia 公司.

1.2 RNA 提取和逆转录

参照文献[6]标准, 取雄性大鼠出生 0 天、9 天、18 天、36 天、72 天各 5 只, 采用断颈处死, 迅速取出脑组织, 均分别取大脑、小脑、脑干、海马各一块标本, 同时取 9 天和 72 天大鼠心肌各一块标本作 RNA 提取. 使用 AMV 反转录酶, 配制反转录反应液合成 cDNA 的第一条链.

1.3 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的克隆

PCR 引物 A1~A8 根据已知大鼠心肌 Nav1.5 钠通道 (rH1) (登录号: M27902) 及人神经母细胞瘤 Nav1.5 钠通道 (hNbR1) (登录号: AB158469) 的基因序列设计共 8 对 (表 1), cDNA 均取自 72 天大鼠大脑, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中经电泳分离, 预期 PCR 片段从琼脂糖凝胶中切割并纯化, A1~A8

*辽宁省教育厅资助项目 (05L500).

** 通讯联系人.

Tel: 024-83283385, E-mail: cmuoushaowujp@msn.com

收稿日期: 2007-05-23, 接受日期: 2007-07-10

这 8 个片段包含大鼠 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的全部编码区域.使用适当的限制性内切酶将此 8 个片段分别在有重叠的部分进行酶切, 得到预期片段

后, 使用 T4 连接酶分别连接, 直至形成完整的 DNA 序列, 在 DNA 序列仪上行序列分析, 详细步骤见参考文献[5].

Table 1 Sequences of primers for isolation and detection of rN1

Primer	Pair sequence (5' to 3') of the forward/reverse	Primers location	Length/bp
A1	GGCAACGTGAGGAGACCTGT/ AGGTCCCCAGGGATTCCCAGACCA	-42~917	961
A2	TTGGTCTGGGAATCCCTGGACCT/CGATGGCGTGGTCTGTCTGG	895~1 902	1 008
A3	CCAGACACGACCACGCCATCG/GAAGAGATTTCAGGACCACAAGGTTG	1 882~2 802	921
A4	CTGGGGAACCTGACACTGGTGC/TGTTCTCTTCATCCTCTTCCT	2 515~3 196	682
A5	GTGCCCCCAGCCCGCAAGGAAA/AGTCGAGCCAGCACCAGGCAT	3 055~3 823	769*
A6	AAGGTCTGGTGGCGGTTGCG/ TCTCCGGTCACGTTCAAGGAC	3 562~4 172	611
A7	AACGTCCTCTCGTCTGCCTCA/ TGAAGAAGAGGATGCCACGGC	4 003~5 254	1252
A8	GCATGGCCAACTTCGCTTATG/TCACACGATGGACTCACGGT	5 021~6 051	1 031
B1	CCTTCTCATCGTGGTCAACA /TCACACGATGGACTCACGGT	5 273~6 051	779

*An additional fragment produced by primer pair A5 with a length of 610 bp (rN1-2).

1.4 竞争性聚合酶链反应

应用上述 PCR 方法, 分别使用 30、35、40 个不同循环对第 5 对引物 (A5) 进行大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位 rN1(769 bp)及其异构体 (剪切 Exon20) rN1-2 (660 bp) 的竞争性 PCR 反应, PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳, 并经 scion image 软件分析, 观察各自在脑组织中的信号强度.

1.5 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位在不同发育阶段各脑叶的分布

引物 B1 (779 bp) (表 1), 根据已知大鼠心肌 Nav1.5 钠通道 α 亚单位序列设计, 所选引物可与其他钠通道序列相区别. PCR 反应体系同上, 模板 cDNA 分别取雄性大鼠出生 0 天、9 天、18 天、36 天、72 天的海马、脑干、小脑、和大脑, 同时取 9 天和 72 天大鼠心肌 cDNA 作对比, 均分别行 35 和 40 个循环扩增. PCR 反应的同时使用 β -actin 引物作为阳性对照, PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳, 并经 scion image 软件分析.

1.6 统计分析

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 采用 One-Way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结 果

2.1 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的克隆

本实验得到的 cDNA 全长为 6 093 bp, 并命名为 rN1(登录号 EF618549), rN1 的开放阅读框架 (open reading frame, ORF)编码 2 016 个氨基酸, rN1 的 α 亚单位的结构模式图如图 1 所示. rN1 的氨基酸序列分析显示具有电压依赖性钠通道的结构特点: 4 个相似的跨膜结构域 (DI~DIV), 其中包括 6 个跨膜片段 (S1~S6), 每个结构域的电压感受器跨膜片段 (S4) 均有正电荷残基. rN1 与 rH1 相比, 有 70 个氨基酸不同, 相似性为 96.53%.与 hNbR1 相比有 78 个氨基酸不同, 相似性为 96.13% (图 2).

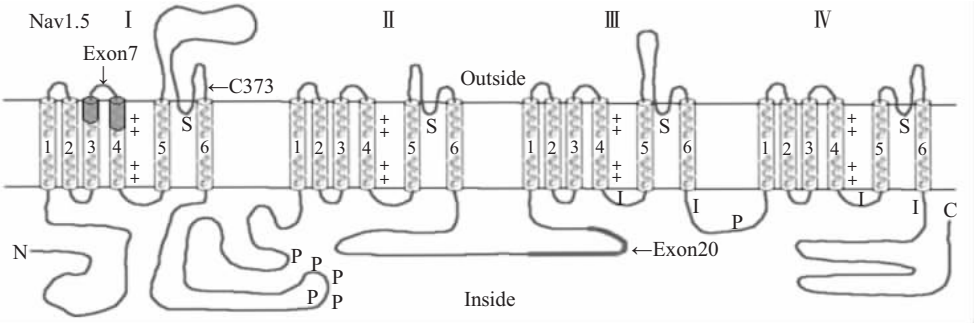


Fig. 1 Putative structure of the α -subunit of rN1

rN1	1:	MANFLLPRGTSSFRRTRESLAAIEKRMAEKQARG-STTLQESREGLPEEEAPRPQLDLQASKKLPDLYGNPPQELIGEPLDLDPFYSTQKTFIVPNKGK	100
hNbR1	1:	MANFLLPRGTSSFRRTRESLAAIEKRMAEKQARG-STTLQESREGLPEEEAPRPQLDLQASKKLPDLYGNPPQELIGEPLDLDPFYSTQKTFIVLNGKG	100
rH1	1:	MANLLPRGTSSFRRTRESLAAIEKRMAEKQARGSATSQESREGLQEEAPRPQLDLQASKKLPDLYGNPPRELIGEPLDLDPFYSTQKTFIVLNGKG	101
D I -S1 D I -S2			
rN1	101:	TIFRFSATNALYVLSFPHPIRRAAVKILVHSLFNTLIMCTILTNCVFMAQHDPWPWKYVEHTFTAIYTFESLVKILARGSCILHAFTFLRGPWNWLDPSV	200
hNbR1	101:	TIFRFSATNALYVLSFPHPIRRAAVKILVHSLFNTLIMCTILTNCVFMAQHDPWPWKYVEHTFTAIYTFESLVKILARGFCLHAFTFLRGPWNWLDPSV	200
rH1	102:	TIFRFSATNALYVLSFPHPYRAAVKILVHSLFNTLIMCTILTNCVFMAQHDPWPWKYVEHTFTAIYTFESLVKILARGFCLHAFTFLRDPWNWLDPSV	201
D I -S3 D I -S4 D I -S5			
rN1	201:	TIMAYVSENKLGNSALRTFRVLRALKTISVIPGLKTIIVGALIQSVKKLADVMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRHKVRNFTALNGINGSVADGLV	300
hNbR1	201:	TIMAYVSENKLGNSALRTFRVLRALKTISVIPGLKTIIVGALIQSVKKLADVMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRHKVRNFTALNGINGSVADGLV	300
rH1	202:	IVMAYTTEFVDLGNVSLRTFRVLRALKTISVIGLKTIVGALIQSVKKLADVMVLTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRHKVRNFTALNGINGSVADGLV	301
D I -SS1 D I -SS2			
rN1	301:	WESLDLYLSDPENYLLKNGTSDVLLCGNSSDAGTCLEGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAWAFALFRLMTQDCWERLYQQLRSAGKIYIMFFMLVIFLG	400
hNbR1	301:	WESLDLYLSDPENYLLKNGTSDVLLCGNSSDAGTCLEGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAWAFALFRLMTQDCWERLYQQLRSAGKIYIMFFMLVIFLG	400
rH1	302:	WNSLDLYLSDPENYLLKNGTSDVLLCGNSSDAGTCLEGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAWAFALFRLMTQDCWERLYQQLRSAGKIYIMFFMLVIFLG	401
D I -S6			
rN1	401:	SFYLVLNLILAVVAMAYEEQNQATIAETEEKEKRFQEAEMLKEHEALTIRGADTVSRSSLEMSPLAPVNSHERRSKRRKRMSSGTEECGEDRLPKSDSE	500
hNbR1	401:	SFYLVLNLILAVVAMAYEEQNQATIAETEEKEKRFQEAEMLKEHEALTIRGADTVSRSSLEMSPLAPVNSHERRSKRRKRMSSGTEECGEDRLPKSDSE	500
rH1	402:	SFYLVLNLILAVVAMAYEEQNQATIAETEEKEKRFQEAEMLKEHEALTIRGADTVSRSSLEMSPLAPVNSHERRSKRRKRMSSGTEECGEDRLPKSDSE	501
D I -S7			
rN1	501:	DGPRAMNHLSTRLGSRSMKPRSSRGSIPTFRRRDLGSEADFADENSTAGESESHITSLVWPPLRRTSAGGQPSGTSAPGHALHGKKNSTVDCNGV	600
hNbR1	501:	DGPRAMNHLSTRLGSRSMKPRSSRGSIPTFRRRDLGSEADFADENSTAGESESHITSLVWPPLRRTSAGGQPSGTSAPGHALHGKKNSTVDCNGV	600
rH1	502:	DGPRALNQLSLTHGLSRSMRPRSSRGSIPTFRRRDLGSEADFADENSTAGESESHITSLVWPPLRHPSAGGQPGPGASAPGYVNGKKNSTVDCNGV	601
D I -S8			
rN1	601:	VSLLAGADPEATSPGSHLLRPVMLEHPPDTPPSEEPGGPQMLTSQAPCYDGEFEPGARQALSAVSVLTSALAEELSESRHKCPPCWNRLAQRYLIWECC	700
hNbR1	601:	VSLLAGADPEATSPGSHLLRPVMLEHPPDTPPSEEPGGPQMLTSQAPCYDGEFEPGARQALSAVSVLTSALAEELSESRHKCPPCWNRLAQRYLIWECC	700
rH1	602:	VSLLAGADPEATSPGSHLLRPVMLEHPPDTPPSEEPGGPQMLTSQAPCYDGEFEPGARQALSAVSVLTSALAEELSESRHKCPPCWNRLAQRYLIWECC	701
D II -S1 D II -S2 D II -S3			
rN1	701:	PLWMSIKQGVKLVMDPXTDLTITXCIVLNTLFMALEHYNMTSEFEEMLVQGNLVFTGIFTAEMTFKIIALDPYFFYQQGWNIFDSIIVILSLMELGLSR	800
hNbR1	701:	PLWMSIKQGVKLVMDPXTDLTITXCIVLNTLFMALEHYNMTSEFEEMLVQGNLVFTGIFTAEMTFKIIALDPYFFYQQGWNIFDSIIVILSLMELGLSR	800
rH1	702:	PLWMSIKQGVKLVMDPXTDLTITXCIVLNTLFMALEHYNMTSEFEEMLVQGNLVFTGIFTAEMTFKIIALDPYFFYQQGWNIFDSIIVILSLMELGLSR	801
D II -S4 D II -S5			
rN1	801:	MSNLSVLSRFLRVFLKAKSWPTLNTLTKIIGNSVGALGNLTVLAIIVFIFAVVGMQLFGKNYSEL--DSGSLPRWHMDDFFHAFILIFRILCGEW	899
hNbR1	801:	MSNLSVLSRFLRVFLKAKSWPTLNTLTKIIGNSVGALGNLTVLAIIVFIFAVVGMQLFGKNYSEL--DSGSLPRWHMDDFFHAFILIFRILCGEW	899
rH1	802:	MGNLSVLSRFLRVFLKAKSWPTLNTLTKIIGNSVGALGNLTVLAIIVFIFAVVGMQLFGKNYSELHRISDSGSLPRWHMDDFFHAFILIFRILCGEW	902
D II -S6			
rN1	900:	IETMWDCEVSGQSLCLLVFLVMVIGNLVVLNLFALLSSFSADNLTAPEDEGMNQLALARIQGLRFVKTITWDFCCGLLRRRPKPAALATHS	999
hNbR1	900:	IETMWDCEVSGQSLCLLVFLVMVIGNLVVLNLFALLSSFSADNLTAPEDEGMNQLALARIQGLRFVKTITWDFCCGLLRRRPKPAALATHS	999
rH1	903:	IETMWDCEVSGQSLCLLVFLVMVIGNLVVLNLFALLSSFSADNLTAPEDEGMNQLALARIQGLRFVKTITWDFCCGLLRRRPKPAALATHS	1002
D III -S1 D III -S2 D III -S3			
rN1	1000:	QLPSCITAPRSPPPPEVEKVPARKETRFEEDEKRPQGQTPGDEPVCVPIAIAESDTEDEEENSLGTEESSKQ--ESQVVSQGHEPYQEPRAWQS	1098
hNbR1	1000:	QLPSCITAPRSPPPPEVEKVPARKETRFEEDEKRPQGQTPGDEPVCVPIAIAESDTEDEEENSLGTEESSKQ--ESQVVSQGHEPYQEPRAWQS	1099
rH1	1003:	QLPSCITAPRSPPPPEVEKVPARKETRFEEDEKRPQGQTPGDEPVCVPIAIAESDTEDEEENSLGTEESSKQ--ESQVVSQGHEPYQEPRAWQS	1101
D III -S4 D III -S5			
rN1	1099:	ETTSSEAGASTSQADWQEQKTEPQAPGCGEPTEDSYSEGSTADMTNTADLLEQIPDLGEDVKDPEDCFTEGCVRRCPCCMVDTTQSPGKVVWRRLKTCY	1198
hNbR1	1100:	ATASSEAEASQADWQEQKTEPQAPGCGEPTEDSYSEGSTADMTNTADLLEQIPDLGEDVKDPEDCFTEGCVRRCPCCMVDTTQAPGKVVWRRLKTCY	1199
rH1	1102:	ETTSSEAGASTSQADWQEQKTEPQAPGCGEPTEDSYSEGSTADMTNTADLLEQIPDLGEDVKDPEDCFTEGCVRRCPCCMVDTTQSPGKVVWRRLKTCY	1201
D III -S6			
rN1	1199:	HIVEHSWFETFIIFMILLSSGALAFEDIYLEERTIKVILEYADKMFYVVFLEMLLKWVAYGFKKYFTNACWLDLFDVDSLSVSLVANTLGAEMGPI	1298
hNbR1	1200:	HIVEHSWFETFIIFMILLSSGALAFEDIYLEERTIKVILEYADKMFYVVFLEMLLKWVAYGFKKYFTNACWLDLFDVDSLSVSLVANTLGAEMGPI	1299
rH1	1202:	HIVEHSWFETFIIFMILLSSGALAFEDIYLEERTIKVILEYADKMFYVVFLEMLLKWVAYGFKKYFTNACWLDLFDVDSLSVSLVANTLGAEMGPI	1301
D III -S7			
rN1	1299:	KSLRTLRLRPLRALSRFEGMRVVVVALVGAIPSMNVLLVCLIFWLIIFSIMGNVLFAGKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSECESENVYTGELYWTKVK	1398
hNbR1	1300:	KSLRTLRLRPLRALSRFEGMRVVVVALVGAIPSMNVLLVCLIFWLIIFSIMGNVLFAGKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSECESENVYTGELYWTKVK	1399
rH1	1302:	KSLRTLRLRPLRALSRFEGMRVVVVALVGAIPSMNVLLVCLIFWLIIFSIMGNVLFAGKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSECESENVYTGELYWTKVK	1401
D III -S8			
rN1	1399:	VNFDNVGAGYLALLQVATFKGWMIDMYAAVDSRGYEEQPWEDNLYMYIYFVVFIFPGSFFTNLNLFIGVLIIDNFNQKKKLGQDIFMTTEEKQKYNAMK	1498
hNbR1	1400:	VNFDNVGAGYLALLQVATFKGWMIDMYAAVDSRGYEEQPWEDNLYMYIYFVVFIFPGSFFTNLNLFIGVLIIDNFNQKKKLGQDIFMTTEEKQKYNAMK	1499
rH1	1402:	VNFDNVGAGYLALLQVATFKGWMIDMYAAVDSRGYEEQPWEDNLYMYIYFVVFIFPGSFFTNLNLFIGVLIIDNFNQKKKLGQDIFMTTEEKQKYNAMK	1501
D IV -S1 D IV -S2			
rN1	1499:	KLGSKKPKQPIPRPLNKYQGFIFDITVKQAFDVTIMFLICLNMVMTMVEEDDQSPKVNILAKINLFFVAIFTGECIVKMAALRHYFTNSWNIFDFVVV	1598
hNbR1	1499:	KLGSKKPKQPIPRPLNKYQGFIFDITVKQAFDVTIMFLICLNMVMTMVEEDDQSPKVNILAKINLFFVAIFTGECIVKMAALRHYFTNSWNIFDFVVV	1599
rH1	1502:	KLGSKKPKQPIPRPLNKYQGFIFDITVKQAFDVTIMFLICLNMVMTMVEEDDQSPKVNILAKINLFFVAIFTGECIVKMAALRHYFTNSWNIFDFVVV	1601
D IV -S3 D IV -S4 D IV -S5			
rN1	1599:	ILSVIGTVLSDI IQKYFFSPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIRTLFALMMSLPALFNIIGLLFLVMFIYSIFGMANFAYYKWEAGIDDMFNQTFAN	1698
hNbR1	1600:	ILSVIGTVLSDI IQKYFFSPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIRTLFALMMSLPALFNIIGLLFLVMFIYSIFGMANFAYYKWEAGIDDMFNQTFAN	1699
rH1	1602:	ILSVIGTVLSDI IQKYFFSPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIRTLFALMMSLPALFNIIGLLFLVMFIYSIFGMANFAYYKWEAGIDDMFNQTFAN	1701
D IV -S6			
rN1	1699:	SMLCLFQITTSAGWDGLLSPILNTGPPYCDPLNPSNGSRGCGSPAVGILFFTTYIIISFLIVNMYIAIILENFSVATEESTEPLSEDDFDMFYE IWE	1798
hNbR1	1700:	SMLCLFQITTSAGWDGLLSPILNTGPPYCDPLNPSNGSRGCGSPAVGILFFTTYIIISFLIVNMYIAIILENFSVATEESTEPLSEDDFDMFYE IWE	1799
rH1	1702:	SMLCLFQITTSAGWDGLLSPILNTGPPYCDPLNPSNGSRGCGSPAVGILFFTTYIIISFLIVNMYIAIILENFSVATEESTEPLSEDDFDMFYE IWE	1801
D IV -S7			
rN1	1799:	KFDPEATQFIEYLA LSDFADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRIHCDILFAFTRKVLGESGEMDALKIQMEEFMAANPSKISYEPITTLRRK	1898
hNbR1	1800:	KFDPEATQFIEYLA LSDFADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRIHCDILFAFTRKVLGESGEMDALKIQMEEFMAANPSKISYEPITTLRRK	1899
rH1	1802:	KFDPEATQFIEYLA LSDFADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRIHCDILFAFTRKVLGESGEMDALKIQMEEFMAANPSKISYEPITTLRRK	1901
D IV -S8			
rN1	1899:	HEEVSA TVIQRAFRRHLLQRSYKHASFLFRQAGGSGLSDEADAPERELIAYMNGNFSRRSAPLSSSSISSTSFPPSYDSVTRATSDNLVPRASDYSRS	1998
hNbR1	1900:	HEEVSA TVIQRAFRRHLLQRSYKHASFLFRQAGGSGLSDEADAPERELIAYMNGNFSRRSAPLSSSSISSTSFPPSYDSVTRATSDNLVQVRGSDYSRS	1998
rH1	1902:	HEEVSA TVIQRAFRRHLLQRSYKHASFLFRQAGGSGLSDEADAPERELIAYMNGNFSRRSAPLSSSSISSTSFPPSYDSVTRATSDNLVPRASDYSRS	2001
D IV -S9			
rN1	1999:	EDLADFPSPDRDRESIV	2016
hNbR1	1999:	EDLADFPSPDRDRESIV	2016
rH1	2002:	EDLADFPSPDRDRESIV	2019

Fig. 2 Sequence comparison of the voltage-gated sodium channels

The amino acid sequence alignment of rN1, hNbR1 (human neuroblastom) and rH1 (rat heart), which are all Nav1.5-type channels is presented. Differences compared with the rN1 sequence are displayed by underneath lineation and dash indicates gaps. The S1~S6 within D I~D IV are shaded. Box portion are exon7 and exon20 of rN1.

8号染色体, 其基因组序列位于 20 731~20 822, 而 rN1 的相应部分也位于第 8 号染色体, 其基因组序列却位于 20 975~21 066, 提示另外一种选择性剪切(图 3b). 基因组序列对比结果显示, rN1 该段序列位于 Nav1.5/SCN5A 第 7 外显子区域, 该外显子具有典型的内含子 / 外显子边界(图 3c), 3'端是(C/T)AG 和 5'端是 GT(A/G)^[6], 提示为一新的外显子, 故命名其为第 7 外显子(登录号: EF502023). 这一结果显示 rN1 由于选择性剪切编码了第 7 外显子, 而不是第 8 外显子. 在使用 A5 引物对时, 电泳后同时出现了比预期条带分子质量略小的另一条带(图 4a), 基因测序证实为剪切了第 20 外显子 (53 个氨基酸) 的新的变构体, 将其命名为 rN1-2 (登录号 EF618550), 我们使用 A5 引物对行 30、35、40 循环竞争性 PCR, 并经电泳结果分析证实, rN1 和 rN1-2 在大鼠脑组织中表达无明显差别 (图 4b).

2.3 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位在不同发育阶段、各脑叶的分布

大鼠大脑、小脑、脑干 Nav1.5 钠通道在同一

发育阶段无明显区别, 但随发育阶段的推进, Nav1.5 钠通道的表达逐渐增多 ($P < 0.05$), 但在出生后 0 和 9 天海马 Nav1.5 钠通道表达明显高于其他脑叶, 随发育阶段推进无明显增长, 出生 72 天还略下降 (图 5, 图 6), 同时, 我们选取 β -actin 作为内参, 结果显示, β -actin 在各脑叶及各不同发育阶段无明显差异 ($P < 0.05$).

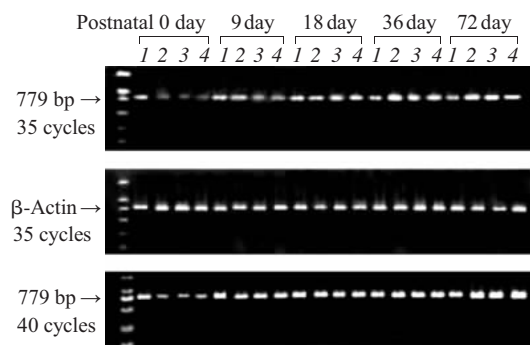


Fig. 5 Electrophoresis picture of rat different lobe of brain in different developmental stage

1: Hippocampus; 2: Brainstem; 3: Cerebellum; 4: Cerebrum.

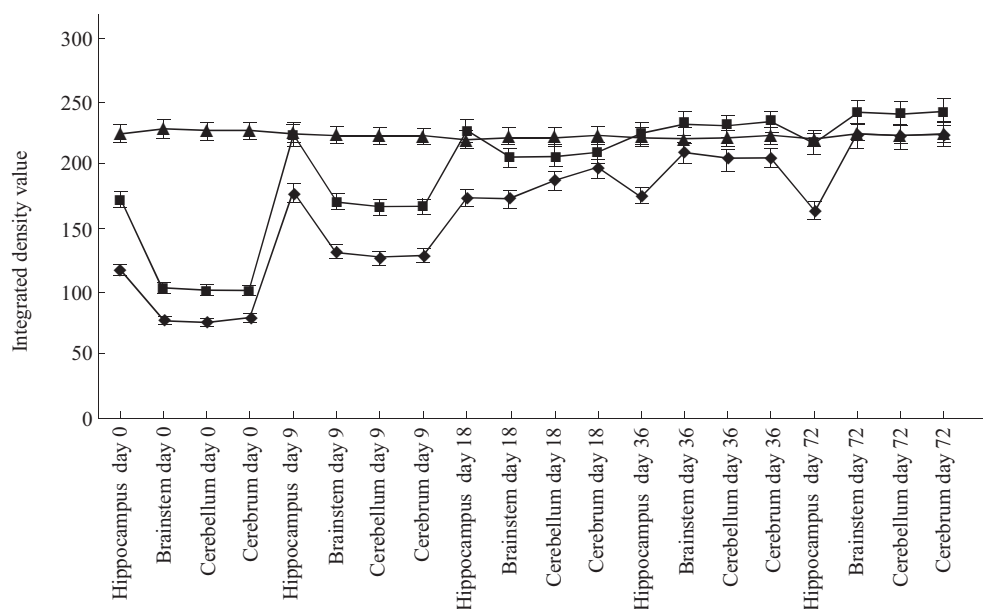


Fig. 6 Correlation of rat electrophoresis picture integrated density value (IDV) in different lobe of brain in different developmental stage

▲—▲: β -actin 35 cycles; ■—■: B1 40 cycles; ◆—◆: B1 35 cycles.

2.4 大鼠大脑与心肌 Nav1.5 钠通道的表达对比

为了证实各个不同发育阶段大鼠脑组织和心肌 Nav1.5 钠通道表达的差别, 我们选取了成年和幼

年大鼠的大脑和心脏分别行 40 循环 PCR 检测, 电泳结果证实, Nav1.5 钠通道的表达成年大鼠心脏 > 幼年大鼠心脏 > 成年大鼠大脑 > 幼年大鼠大脑 (图 7).

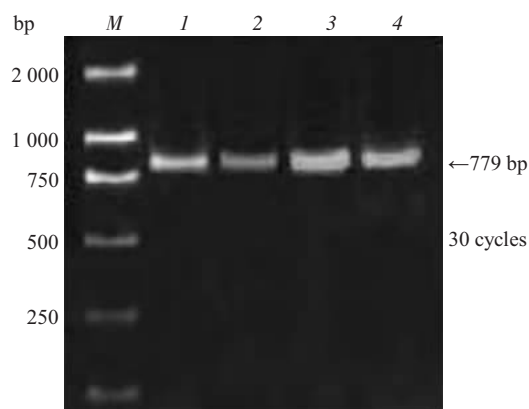


Fig. 7 Different expressions of SCN5A in postnatal day 9 and day 72 in rat cerebrum and heart

M: Marker; 1: Rat cerebrum of postnatal day 72; 2: Rat cerebrum of postnatal day 9; 3: Rat heart of postnatal day 72; 4: Rat heart of postnatal day 9.

3 讨 论

钠通道对可兴奋细胞动作电位除极时初始内向电流负责, 因此, 对心脏和神经的功能至关重要. 在人和大鼠, 编码 Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.7 的基因都位于染色体 2, 均为 TTX 敏感型 (TTX-S). 人类编码 Nav1.5、Nav1.8、Nav1.9 的第二组基因位于染色体 3p21~24, 而大鼠 Nav1.8、Nav1.9 则位于染色体 9^[1], 其中 Nav1.5 为 TTX 抵抗型 (TTX-R), Nav1.8 和 Nav1.9 为 TTX 不敏感型 (TTX-I). Nav1.4、Nav1.6 氨基酸序列与染色体 2 编码的通道较一致. Nav1.5 钠通道与 TTX-S 不同的原因, 仅仅是 D I 中 P 区苯丙氨酸 (phenylalanine) 的相应位置变为半胱氨酸 (cysteine), 结果导致 Nav1.5 钠通道对 TTX 敏感性明显降低^[5].

3.1 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道的克隆和对比

rN1 的基因序列与 rH1 相比, 其相似性达 96.53%, 并具有 rH1 所编码的相同结构, 包括 4 个跨膜结构域, 每个结构域包含约 300 个氨基酸, 由 6 个跨膜片段组成, 并且 S4 片段也含有一些带正电荷的氨基酸残基, 起电压感受器的作用. 在 D I 的 P 环存在的半胱氨酸残基 (C373) 提示该通道为 TTX-R 钠通道, 因此可以认为 rN1 和 rH1 来自于同一钠通道亚家族, 为 Nav1.5/SCN5A 钠通道, 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道 α 亚单位基因的全部克隆, 充分证实了 Nav1.5 钠通道不只是心肌独有的离子通道. rN1 氨基酸序列为 2 016 个, 与 rH1 序

列比较, 少 3 个氨基酸, 但却与 hNbR1 一致. 与 rH1 不同的氨基酸序列大部分集中在 D I 区和 D II 区, 而与 hNbR1 不同的却主要集中在 D II 区和 D III 之间和 D IV 区之后的部分, rN1 与 rH1 不同的氨基酸达 70 个, 而 hNbR1 与人心肌 Nav1.5 钠通道 (hH1) 比较却只差 15 个氨基酸^[9], 这种差异是否和种属有关、两者电生理功能是否相似还需进一步探讨.

电压-门控钠通道的开放或钠离子流的发生是引起心肌和神经细胞快反应动作电位的第一个电生理学活动, 它是引起以后各离子通道或离子流活动的前提条件. 钠离子通道在脑组织和心肌细胞的过度活动和功能衰减与许多疾病密切相关. 癫痫就是钠离子通道局部过度激活引起的病理改变, 而应用钠通道的阻滞剂例如苯妥英 (phenytoin) 或拉莫三嗪 (lamotrigine) 却能阻止癫痫的发生^[7]. 另外, 钠通道的阻滞剂在中风或其他原因引起的疼痛中也能起到很好的效果^[8]. 脑组织中也存在较多的 TTX 敏感型 (TTX-S) 钠通道 (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 和 Nav1.7^[9]), 但拉莫三嗪和西帕曲近 (sipatrigine) 对 Nav1.5 钠通道较 TTX 敏感型钠通道敏感 5~20 倍, 并且对心肌影响较小, 这从另一个角度说明癫痫与 Nav1.5 钠通道有密切的关系, 对癫痫的诊断和治疗有重要的指导意义^[7].

近年来, 已经阐明, 钠通道的基因突变引起的蛋白质结构和 / 或功能的改变, 在一些疾病的病理变化中起着重要的作用, 如高血钾性周期性麻痹、家族遗传性癫痫、婴儿猝死综合征 (sudden infant death syndrome, SIDS) (A997S 突变)^[10]、先天性长 QT 综合征 (LQT3) (S941N 或 D1114N 突变)、Brugada 综合征 (T353I 突变) 和自发性心室纤颤 (idiopathic ventricular fibrillation, IVF) 等^[4,11], 其中, 后四者已被证实与 Nav1.5/SCN5A 的基因突变有关.

3.2 大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道基因的选择性剪切

目前, 哺乳动物 SCN5A 钠通道基因序列中共发现 30 个外显子, 分布在基因组序列 98 723 个核苷酸序列之中, 在 rN1 核酸序列中, 未能检测到像 rH1 的第 8 外显子所表达基因序列, 而是在同一部位检测到了第 7 外显子序列, 这和 hNbR1 的克隆比较类似 (当时命名为 6A 外显子)^[9], 也未见第 7 外显子异构体在心肌上表达的报道. 在大脑和心肌第 7/8 外显子选择性剪切的不同, 可能与大脑和心肌的功能不同有关, 这个问题还需进一步行电生理检查进行深入的探讨和研究.

基因的选择性剪切多发于哺乳动物的免疫、神经等复杂系统,与疾病和发育调控密切相关,是离子通道形成多样性结构和功能的关键,被认为是在相对简单的基因组基础上提高蛋白质组多样性的重要机制之一.选择性剪切一般可分为5'选择性剪切(alternative 5' splicing)、3'选择性剪切(alternative 3' splicing)^[12]、内含子保留(intron retention)、外显子遗漏(exon skipping)和互斥外显子(mutually exclusive exons)等5种^[13],选择性剪切发生在mRNA的不同区域既可能改变蛋白质的表达水平,也可能会形成蛋白异构体.随生物体复杂程度的增加,出现选择性剪切的概率就明显增加,这种机制本身可能助长复杂度的演化,并能驱动生物进一步演化,错误的基因剪切也可能导致癌症和先天性缺陷疾病的发生.电压门控钠通道基因的选择性剪切现象已经在多种物种中被发现,其中在心肌比较常见,例如,mH1是小鼠心肌的主要钠通道类型,为心肌细胞兴奋的结构基础,其基因被发现具有2个选择性剪切的异构体mH1-2和mH1-3(mH1-2缺失第18外显子;mH1-3第17、18外显子均缺失),膜片钳检测证实mH1和mH1-2的电生理特性无明显差别,但mH1-3却无明显功能电流显示^[6],这充分说明选择性剪切在心肌细胞功能的调节上起着重要的作用.

需要指出的是,在对rN1进行克隆时,在A5引物的序列中,经测序证实,发现了一个剪切了159个碱基的新序列,经序列对比,该剪切定位于第20外显子区域,为缺少了53个氨基酸的一个新的异构体(命名为rN1-2).这在大鼠脑组织中首次被发现,经比较与rN1在脑组织中的表达无明显差别(图7),这与hNbR1结论类似^[9],其与小鼠心肌mH1基因的选择性剪切mH1-2(当时NCBI SCN5A定位为18外显子)剪切的序列大小相同,但在大鼠脑组织中未发现类似mH1-3那样剪切2个外显子的剪切体^[6],而与我们以前在hNbR1上发现的第20外显子区域的选择性剪切序列(hNbR1-2)比较,rN1-2的剪切体较hNbR1-2少一个氨基酸(Q)(当时NCBI定位为18外显子)并且有多达17个氨基酸不同.电生理检测已经证实hNbR1和hNbR1-2功能也无明显差别^[9],由此可以推断,大鼠rN1和rN1-2可能在功能上也无明显区别,但20外显子区域众多的氨基酸序列差别,是否导致rN1和hNbR1功能会有差异,这还需要行电生理进一步证实.

3.3 大鼠 Nav1.5 钠通道在不同发育阶段各脑叶的分布

不同类型的钠通道在不同部位表达是不同的,Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 和 Nav1.7 主要表达于中枢神经系统^[9]; Nav1.4 分布于骨骼肌, Nav1.8 和 Nav1.9 在周围神经系统中表达^[14], Nav1.5 是心肌的主要钠通道类型,近些年也被发现表达在脑组织、骨骼肌、肺等处^[15].有报道在成人和胎儿大脑中表达较高,而在小脑中表达较少^[9],也被发现广泛分布于海马、杏仁核和前梨状皮质等边缘系统^[16].

作者发现,大鼠虽然全脑均有 Nav1.5 钠通道分布,但在不同发育阶段不同脑叶分布是有明显差别的,在大脑、小脑、脑中同一发育阶段中 rN1 的表达无明显变化,但大脑、小脑、脑干 rN1 钠通道表达随着发育阶段的推进逐渐增多($P < 0.05$),且成年鼠小脑中的表达也较多,可能和大鼠神经随发育阶段的推进各个系统的结构和功能逐渐发育完善有关. rN1 在大鼠海马中 Nav1.5 钠通道各不同发育阶段与其他各脑叶有明显的区别,刚出生时的表达较低,随着生长发育,表达逐渐增加,到成年后又略有减少(图5, 6).脑组织虽然是一个密不可分的有众多功能联系的有机体,但海马等边缘系统与情感性行为 and 记忆等有直接的关系,与癫痫等疾病的密切关系也越来越受到重视.同时我们也注意到,Nav1.5 钠通道确实是心肌的主要钠通道,在心肌的表达明显多于脑组织,其表达趋势是成年鼠心肌 > 幼鼠心肌 > 成鼠大脑 > 幼鼠大脑(图7),Nav1.5 钠通道在边缘系统发挥独特的功能和作用,它可能是家族遗传性癫痫^[7]等发作性疾病有关结构和功能的基础,因此明确其在各不同发育阶段和各脑叶的分布,对以后癫痫等疾病的诊断和治疗,具有重要的指导意义.

参 考 文 献

- 1 Goldin C A L, Waxman S G. International union of pharmacology. XXXIX. compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev*, 2003, **55** (4): 575~578
- 2 Yu F H, Westenbroek R E, Silos-Santiago I, *et al.* Sodium channel beta4; a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci*, 2003, **23** (20): 7577~7585
- 3 Goldin R L, Barchi J H, Caldwell F, *et al.* Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 2000, **28** (2): 365~368
- 4 Kerr N C H, Holmes F E, Wynn D. Novel isoforms of the sodium channels Na_v1.8 and Na_v1.5 are produced by a conserved mechanism in mouse and rat. *Biol Chem*, 2004, **279** (23): 24826~24833
- 5 Ou S W, Kameyama A, Hao L Y, *et al.* Tetrodotoxin-resistant Na⁺

- channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *European Journal of Neuroscience*, 2005, **22** (4): 793~801
- 6 Zimmer T, Bollensdorff C, Haufe V, *et al.* Mouse heart Na⁺ channels: primary structure and function of two isoforms and alternatively spliced variants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **282** (3): 1007~1017
 - 7 Gersdorff Korsgaard M P, Christophersen P, Ahring P K, *et al.* Identification of a novel voltage-gated Na⁺ channel rNa(v)1.5a in the rat hippocampal progenitor stem cell line HiB5. *Pflugers Arch*, 2001, **443** (1): 18~30
 - 8 Gold M S. Sodium channels and pain therapy. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2000, **13** (5): 565~572
 - 9 Goldin A L. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol*, 2002, **205** (5): 575~584
 - 10 Ackerman M J, Siu B L, Sturner W Q, *et al.* Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *J Am Med Assoc*, 2001, **286** (18): 2264~2269
 - 11 Pfahnl A E, Viswanathan P C, Weiss R, *et al.* A sodium channel pore mutation causing Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 2007, **4** (1): 46~53
 - 12 Shang L L, Dudley S C, Jr. Tandem promoters and developmentally regulated 5'- and 3'-mRNA untranslated regions of the mouse Scn5a cardiac sodium channel. *J Biol Chem*, 2005, **280** (2): 933~940
 - 13 Ast G. How did alternative splicing evolve. *Nat Rev Genet*, 2004, **5** (10): 773~782
 - 14 Dib-Hajj S D, Tyrrell L, Waxman S G. Structure of the sodium channel gene SCN11A: evidence for intron-to-exon conversion model and implications for gene evolution. *Mol Neurobiol*, 2002, **26** (2~3): 235~250
 - 15 Ou Y, Gibbons S J, Miller S M. SCN5A is expressed in human jejunal circular smooth muscle cells. *Neurogastroenterol Mot*, 2002, **14** (5): 477~486
 - 16 Hartmann H A, Colom L V, Sutherland M L, *et al.* Noebels Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nature Neuroscience*, 1999, **2** (7): 593~595

Cloning and Distribution Analysis of Nav1.5 Sodium Channel in Rat Brain*

REN Cheng-Tao¹⁾, OU Shao-Wu^{1)**}, WANG Yun-Jie¹⁾, LIN Yi¹⁾, ZONG Zhi-Hong²⁾

¹⁾Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China;

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract To clarify the gene and molecule characters of the tetrodotoxin-resistant (TTX-R) voltage-gate sodium channel and the distribution in different lobe of brain in different developmental stage, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to clone the full sequence of Nav1.5 sodium channel (designated as rN1) α subunit in rat brains and the distribution was compared in different lobe of brain in different developmental stage. The open reading frame(ORF) of rN1 encodes 2016 amino acid residues and sequence analysis indicated that rN1 is highly homologous with 96.53% amino acids identity to rat cardiac Nav1.5 sodium channel (rH1) and 96.13% amino acids identity to human neuroblastoma Nav1.5 sodium channel (hNbR1). It has all the structural features of a voltage-gated sodium channel and the presence of a cysteine residue (C373) in the pore loop region of domain I suggests that this channel is TTX resistant. A new exon (exon7) that distinct from rN1 was found in D I -S3~S4. In addition, an alternative splicing isoforms that deleted 53 amino acids(exon20) was found in the loop between D II ~ III in rN1 (designated as rN1-2). Distribution result demonstrated that rN1 expressed discrepancy in different ages and lobe in brain. The expression level of rN1 was gradually more stable in adult than neonatal. These results suggest that Nav1.5 has a newly identified exon for alternative splicing and is more widely expressed than previously thought.

Key words rat, sodium channel, gene cloning, distribution, brain

*This work was supported by a grant from The Department of Education of Liaoning Province(05L500).

**Corresponding author . Tel: 86-24-83283385, E-mail: cmuoushaowujp@msn.com

Received: May 23, 2007 Accepted: July 10, 2007