

Nav1.5/SCN5A 基因新的变构体 编码人脑组织 Nav1.5 Na⁺通道*

欧绍武^{1)**,**} 宗志红^{2)**} 王 军¹⁾ 王运杰¹⁾

(¹⁾中国医科大学附属一院神经外科, 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 河豚毒 - 抵抗性(TTX-R) Nav1.5 Na⁺通道是心肌的特异性 Na⁺通道, 虽然研究发现神经元中也存在河豚毒 - 抵抗性 Na⁺电流及 Nav1.5/SCN5A mRNA 的表达, 但其确切的 cDNA 序列尚不清楚. 采用 RT-PCR 法对人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 进行克隆发现: 人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 有 2 种变构体, hB1 和 hB2 (accession number EF629346, EF629347), 其中 hB1 全长 6 201 个碱基, 其开放读码框架(ORF)参与编码 2 016 个氨基酸, 和人心肌 Nav1.5 Na⁺通道氨基酸序列相同率高达 98%, 共有 28 个不同的氨基酸, 其中 7 个集中于第 6A 外显子与第 6 外显子编码区. 与人心肌 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 不同的是, 在对人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 的克隆中未发现该基因第 18 外显子的选择性剪接, 但却发现其第 24 外显子的选择性剪接, 2 种选择性剪接体 (hB1 和 hB2) 在脑组织中基本同时表达, 表达比率接近 1:1, 但在心脏中二者的表达比率却与年龄有关. 人 Nav1.5/SCN5A 基因的第 24 外显子定位于染色体 3P21 区, 共有 54 个碱基, 参与编码 18 个氨基酸. RT-PCR 法证实第 24 外显子的选择性剪接也可发生在大鼠心脑之外的其他组织中, 竞争性 PCR 法证明, 不同组织中 2 种选择性剪接体的表达比率不同, 且随着周龄的增加, 2 种选择性剪接体在各组织中表达的变化趋势不同. 此外, RT-PCR 法还发现 Wistar 大鼠全身 16 种组织中均可检测到 Nav1.5/SCN5A mRNA 的表达. 上述实验结果说明, Nav1.5 Na⁺通道在全身组织中分布广泛, 但编码人脑组织 Nav1.5 Na⁺通道与心肌组织该离子通道的 cDNA 序列不同, 是 Nav1.5/SCN5A 基因的 2 种变构体, 这为深入研究不同组织中 Nav1.5 Na⁺通道的功能提供了基础.

关键词 Nav1.5/SCN5A 基因, 基因克隆, 选择性剪接, 脑组织

学科分类号 Q71

电压 - 门控 Na⁺通道(VGSC)是可兴奋细胞动作电位产生和传导的重要离子通道, 根据其其对河豚毒(TTX)敏感与否, VGSC 可分为 2 类, 一类是河豚毒敏感型(TTX-S) Na⁺通道, 包括 Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 和 Nav1.7 Na⁺通道, 另一类对河豚毒不敏感(TTX-I)甚至抵抗(TTX-R), 包括 Nav1.5, Nav1.8 和 Nav1.9 Na⁺通道^[1~5]. 其中 TTX-S 型 Nav1.1, Nav1.2 和 Nav1.3 Na⁺通道在神经元中分布广泛并首先在鼠脑组织中被成功克隆, 故被称为脑型 Na⁺通道^[1], 但最近的研究发现, 神经元中也存在 TTX-R 型 Na⁺电流, 并且可以检测到参与编码 TTX-R 型 Na⁺通道的 Nav1.5/SCN5A mRNA 的表达^[1, 6~9], 提示神经元中也存在 TTX-R 型 Nav1.5 Na⁺通道, 但编码该离子通道确切的 cDNA 序列尚不清楚, 它与心肌 Nav1.5 Na⁺通道结构和功能的差异也不明了, 所以本实验

对人脑 Nav1.5/SCN5A cDNA 进行了全序克隆, 发现, 编码人脑组织 Nav1.5 Na⁺通道与心肌组织该离子通道的 cDNA 序列不同, 是 Nav1.5/SCN5A 基因的 2 种变构体, 同时, 本实验还发现 Nav1.5/SCN5A 基因又一个新的选择性剪接, 并对 Wistar 大鼠全身 16 种组织中 Nav1.5 Na⁺通道 mRNA 表达情况进行了检测和分析.

1 材料和方法

1.1 材料

人脑组织来源于中国医科大学附属一院神经外科一颅底脑膜瘤患者行肿瘤切除术中内减压额叶

*辽宁省教育厅资助项目(05L500).

** 并列第一作者.** 通讯联系人.

Tel: 024-83283385, 024-83283396,

E-mail: cmuoushaowujp@msn.com

收稿日期: 2007-06-25, 接受日期: 2007-08-17

(皮质). 健康雄性 Wistar 大鼠(P1~P120)由中国医科大学实验动物中心提供. 总 RNA 提取及 RT-PCR 试剂盒由 Takara 公司(Japan) 提供, 凝胶回收及质粒提取试剂盒由 QIAGEN 公司(USA) 提供, PGEM-T 载体来自 Promega 公司(USA), 基因测序用 3700 自动基因测序仪(USA). 本实验符合 Helsinki 宣言的要求并得到中国医科大学伦理委员会的批准和实验动物中心的认可.

1.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR

采用 Trizol 试剂一步法提取脑组织总 RNA,

紫外分光光度计测定纯度并定量, 分别进行反转录合成 cDNA, 参考人心肌 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 序列 hH1 (accession number M77235) 设计可以扩增 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 全序的 10 对引物(P1~P10)进行 PCR 反应, 得到 10 段(相邻片段之间有部分重叠序列)Nav1.5/SCN5AcDNA 片段(表 1), 每个样品的 RT-PCR 反应及每次 RT-PCR 实验至少重复 3 次.

Table 1 Primer sequences

Primers	Forward	Reverse	Length/bp
P1	5' GGCAACGTGAGGAGAGCCTGT 3'	5' AGGTCCAGGGATTCCCAGACCA 3'	959
P2	5' TGGTCTGGGAATCCCTGGACCT 3'	5' CGATGGCGTGGTCGTGTCTGG 3'	1 006
P3	5' CCAGACACGACCACGCCATCGF 3'	5' CAGGTGGTCCGCTTGACAAA 3'	996
P4	5' TTCAGTGCAGACAACCTCACA 3'	5' TGTTCCTCTCATCCTCTTCTT 3'	373
P5	5' GTGCCTCCCAACCGCAAGGAAA 3'	5' AGATGATGAATGTCTCGAACC 3'	583
P6	5' CAGGGAAGGTCTGGTGGCG 3'	5'-AGTCGAGCCAGCACCAGGCAT 3'	412
P7	5' TGCTCAAGTGGGTGGCCTACGGC 3'	5'-TCTCCGGTCAAGTTCAAGGAC 3'	412
P8	5' AACGTCCTCCTCGTCTGCCTCA 3'	5' GGATGATGTCCGAGAGCACAGTG 3'	778
P9	5' CACTGTGCTCTCGGACATCATCC 3'	5' TGAAGAAGAGGATGCCCCACGGC 3'	1 252
P10	5' GCATGGCCAACTTCGCTTATG 3'	5' TCACACGTAGGACTCACGGT 3'	1 028
P11	5' CCTTCTCATCGTGGTCAACATGTACA 3'	5' TCACACGTAGGACTCACGGT 3'	776
P12	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	452
P13	5' AACGTCCTCCTCGTCTGCCTCA 3'	5' GTTGACAATACTCGCCTGTGAAG 3'	728 ¹⁾
P14	5' GCCAACCGTGAAAAGATG 3'	5' CCAGGATAGAGCCACCAAT 3'	701
P15	5' GGGACCTGACTGACTACCTC 3'	5' ACTCGTCATACTCCTGCTTG 3'	546

¹⁾ Amplification with primer P13 produced an additional fragment with a length of 674 bp, which was proved to be the alternative splicing of exon24. P11: Primer used for detecting the expressions of Nav1.5/SCN5A in rat tissues. P12: Primer for amplification of GAPDH of rat. P14: Primer for amplification of β -actin of rat. P15: Primer for amplification of β -actin of human.

1.3 基因克隆

PCR 产物经凝胶回收纯化后, 连到 PGEM-T 载体, 而后转化到感受态细胞中进行克隆扩增, 提取质粒后自动基因测序仪测序, 去除中间部分重叠序列, 得到人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 全序.

1.4 竞争性 (Competitive) PCR

为研究 2 种选择性剪切体的表达比率, 应用竞争性 PCR, 即改变 PCR 的循环次数, 而其他反应条件保持不变. 反应结束后, 凝胶图像分析系统进行灰度分析, 每种选择性剪切体的表达值以 $A_{\text{变构体}}/A_{\beta\text{-actin}} \times 100\%$ 表示, 结果分析以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示.

2 结 果

2.1 人脑组织 Nav1.5/SCN5A 的基因克隆及与 hH1 和 hNbR1 的比较

人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 有 2 种变构体, 命名为 hB1 和 hB2, 其中 hB1 全长 6 201 个碱基, 其开放读码框架(ORF)参与编码 2 016 个氨基酸, 和人心肌 Nav1.5 Na^+ 通道氨基酸序列相同率高达 98%, 共有 28 个不同氨基酸, 其中的 7 个集中位于第 6A 和第 6 外显子编码区, 其余不同氨基酸分布情况如下: D I 区 16 个, Loop I ~ II 区 2 个, D II 区 1 个, Loop II ~ III 区 5 个, D III 区

1个, Loop III~IV区0个, DIV区3个. 和人神经母细胞瘤细胞 Nav1.5 Na⁺通道相比, 有20个氨基酸不同, 分布情况如下: D I区8个, Loop I~II

区2个, D II区1个, Loop II~III区4个, D III区1个, Loop III~IV区0个, DIV区4个(图1).

hB1	MANFLLPRGTSFRRFTRESLAAIEKRMAEKQARGSTTLQESRBGLPEEBEAPRPQDLQASKKLPDLYGNPPQELIGEPLEDLDFYSTQRTFIVPNKGKTIIFRSATNALYVLSFPFHP	120
hH1	MANFLLPRGTSFRRFTRESLAAIEKRMAEKQARGSTTLQESRBGLPEEBEAPRPQDLQASKKLPDLYGNPPQELIGEPLEDLDFYSTQRTFIVPNKGKTIIFRSATNALYVLSFPFHP	
hNbR1	MANFLLPRGTSFRRFTRESLAAIEKRMAEKQARGSTTLQESRBGLPEEBEAPRPQDLQASKKLPDLYGNPPQELIGEPLEDLDFYSTQRTFIVPNKGKTIIFRSATNALYVLSFPFHP	
hB1	RRAAVKILVHSLFNMLIMCTILTNCVFMQAHDPPPWTKIYVEYTFTAIYTFESLVKILARGSCFHAFTFLRGFNNWPDFSVIIMAYVSENIKLGNSALRTRFVRLAKTKISVIPGLKTIIV	240
hH1	RRAAVKILVHSLFNMLIMCTILTNCVFMQAHDPPPWTKIYVEYTFTAIYTFESLVKILARGSCFHAFTFLRGFNNWPDFSVIIMAYTTFVDFLGNVSALRTRFVRLAKTKISVIPGLKTIIV	
hNbR1	RRAAVKILVHSLFNMLIMCTILTNCVFMQAHDPPPWTKIYVEYTFTAIYTFESLVKILARGSCFHAFTFLRGFNNWPDFSVIIMAYVSENIKLGNSALRTRFVRLAKTKISVIPGLKTIIV	
hB1	GALIQSVKKLADIMVLTVPCLSVFALIGLQLFMGNLRHKCRVNRPTALNGTNGSVADGLVWESLDLYLSDPENYLLKNGTSDVLLCGNSSDAGTCLBGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAW	360
hH1	GALIQSVKKLADIMVLTVPCLSVFALIGLQLFMGNLRHKCRVNRPTALNGTNGSVADGLVWESLDLYLSDPENYLLKNGTSDVLLCGNSSDAGTCLBGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAW	
hNbR1	GALIQSVKKLADIMVLTVPCLSVFALIGLQLFMGNLRHKCRVNRPTALNGTNGSVADGLVWESLDLYLSDPENYLLKNGTSDVLLCGNSSDAGTCLBGYRCLKAGENPDHGYTSFDSFAW	
hB1	AFLALPRLMTQDCWRLYQQTLRSAGKIYMIFFMLVIFLGSFYLVNLI LAVVAMAYEBQNGQATIAETEEKEKRFQEAEMEMLKKEHEALTIRGVDTVSRSSLEMSPLAPVNSHERRSKRRK	480
hH1	AFLALPRLMTQDCWRLYQQTLRSAGKIYMIFFMLVIFLGSFYLVNLI LAVVAMAYEBQNGQATIAETEEKEKRFQEAEMEMLKKEHEALTIRGVDTVSRSSLEMSPLAPVNSHERRSKRRK	
hNbR1	AFLALPRLMTQDCWRLYQQTLRSAGKIYMIFFMLVIFLGSFYLVNLI LAVVAMAYEBQNGQATIAETEEKEKRFQEAEMEMLKKEHEALTIRGVDTVSRSSLEMSPLAPVNSHERRSKRRK	
hB1	RMSSGTBECGEDRLPKSDSEDPGRAMNHLSTRGLNRTSMKPSRSGSIPTFRRLDLSGEADFADDENSTAGESESHHTSLVWPWLRRTSAQQGPGSPGTSAPGHALHGKKNSTVDCNGV	600
hH1	RMSSGTBECGEDRLPKSDSEDPGRAMNHLSTRGLNRTSMKPSRSGSIPTFRRLDLSGEADFADDENSTAGESESHHTSLVWPWLRRTSAQQGPGSPGTSAPGHALHGKKNSTVDCNGV	
hNbR1	RMSSGTBECGEDRLPKSDSEDPGRAMNHLSTRGLNRTSMKPSRSGSIPTFRRLDLSGEADFADDENSTAGESESHHTSLVWPWLRRTSAQQGPGSPGTSAPGHALHGKKNSTVDCNGV	
hB1	VSLLAGDPEATSPGSHLLRPVMLEHPPDTTTPSEBPGPQMLTSQAPCVDGFEPEGARQALSAVSVLTSALBEELESRHKCPPCWNRLAQRYLWIBCCPLWMSIKQGVKLVVMDPPTD	720
hH1	VSLLAGDPEATSPGSHLLRPVMLEHPPDTTTPSEBPGPQMLTSQAPCVDGFEPEGARQALSAVSVLTSALBEELESRHKCPPCWNRLAQRYLWIBCCPLWMSIKQGVKLVVMDPPTD	
hNbR1	VSLLAGDPEATSPGSHLLRPVMLEHPPDTTTPSEBPGPQMLTSQAPCVDGFEPEGARQALSAVSVLTSALBEELESRHKCPPCWNRLAQRYLWIBCCPLWMSIKQGVKLVVMDPPTD	
hB1	LTITMCI VNLTFMFLAHEHYNMTSEFEEMLQGVNLVFTGIFTAEMTFKIALDPYFFYQGGNIPFDSIIVILSLMELGLSRMSNLSVLRSPFLLRVFLAKSWPTLNTLIKIIGNSVGALG	840
hH1	LTITMCI VNLTFMFLAHEHYNMTSEFEEMLQGVNLVFTGIFTAEMTFKIALDPYFFYQGGNIPFDSIIVILSLMELGLSRMSNLSVLRSPFLLRVFLAKSWPTLNTLIKIIGNSVGALG	
hNbR1	LTITMCI VNLTFMFLAHEHYNMTSEFEEMLQGVNLVFTGIFTAEMTFKIALDPYFFYQGGNIPFDSIIVILSLMELGLSRMSNLSVLRSPFLLRVFLAKSWPTLNTLIKIIGNSVGALG	
hB1	NLTVLVLAIVFIAVVGMLQFQKNYSELSDSDGLPRWHMDDFFHAPLIIFRILCGEWIETMWDOMEVSGQSLCLLVFLVMVIGNLVNLFALLSSFSADNLTAPDEDMNNLQ	960
hH1	NLTVLVLAIVFIAVVGMLQFQKNYSELSDSDGLPRWHMDDFFHAPLIIFRILCGEWIETMWDOMEVSGQSLCLLVFLVMVIGNLVNLFALLSSFSADNLTAPDEDMNNLQ	
hNbR1	NLTVLVLAIVFIAVVGMLQFQKNYSELSDSDGLPRWHMDDFFHAPLIIFRILCGEWIETMWDOMEVSGQSLCLLVFLVMVIGNLVNLFALLSSFSADNLTAPDEDMNNLQ	
hB1	LALARIQRLRFVKRTTWDFCCGILLRHPQKPAALAAQGLPSCIATPYSPPPPETEKVPPTRKETQFEEBEGQGGTGPDPPEVCPVIAVAESDTDQDEEENSLGTEBESSKQESQ	1080
hH1	LALARIQRLRFVKRTTWDFCCGILLRHPQKPAALAAQGLPSCIATPYSPPPPETEKVPPTRKETQFEEBEGQGGTGPDPPEVCPVIAVAESDTDQDEEENSLGTEBESSKQESQ	
hNbR1	LALARIQRLRFVKRTTWDFCCGILLRHPQKPAALAAQGLPSCIATPYSPPPPETEKVPPTRKETQFEEBEGQGGTGPDPPEVCPVIAVAESDTDQDEEENSLGTEBESSKQESQ	
hB1	PVSGGPEAPDSRTWSQVSATASSEAEASASQADWRQWKAEPQAGCGETPEDSCSEGSTADMTNTAELLBQIPDLQDVKDPEDCFTGCVRRCPCCAVDTTQAPGKVVWRLRKTCTYH	1200
hH1	PVSGGPEAPDSRTWSQVSATASSEAEASASQADWRQWKAEPQAGCGETPEDSCSEGSTADMTNTAELLBQIPDLQDVKDPEDCFTGCVRRCPCCAVDTTQAPGKVVWRLRKTCTYH	
hNbR1	PVSGGPEAPDSRTWSQVSATASSEAEASASQADWRQWKAEPQAGCGETPEDSCSEGSTADMTNTAELLBQIPDLQDVKDPEDCFTGCVRRCPCCAVDTTQAPGKVVWRLRKTCTYH	
hB1	IVHSWFETPIIFMILLSSGALAFEDIYLBERTIKIVLLEYADKMFYVVFVLEMLKWAYAGFKYFTNANCWLDPLIVDVSLSLVANTLGFAMGPIKSLRTLRLALRPLALSRLF	1320
hH1	IVHSWFETPIIFMILLSSGALAFEDIYLBERTIKIVLLEYADKMFYVVFVLEMLKWAYAGFKYFTNANCWLDPLIVDVSLSLVANTLGFAMGPIKSLRTLRLALRPLALSRLF	
hNbR1	IVHSWFETPIIFMILLSSGALAFEDIYLBERTIKIVLLEYADKMFYVVFVLEMLKWAYAGFKYFTNANCWLDPLIVDVSLSLVANTLGFAMGPIKSLRTLRLALRPLALSRLF	
hB1	RVVVNALVGAIPSIMNVLVYCHIFWLFISIMGVNLFACKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSQCESLNTGELYWTKVKVNFNDVAGYALLQVATFKGWMIMYAAYDSRGYEEQPQW	1440
hH1	RVVVNALVGAIPSIMNVLVYCHIFWLFISIMGVNLFACKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSQCESLNTGELYWTKVKVNFNDVAGYALLQVATFKGWMIMYAAYDSRGYEEQPQW	
hNbR1	RVVVNALVGAIPSIMNVLVYCHIFWLFISIMGVNLFACKFGRCINQTEGDLPLNYTIVNNKSQCESLNTGELYWTKVKVNFNDVAGYALLQVATFKGWMIMYAAYDSRGYEEQPQW	
hB1	EYNLYMYIYFVIFIFGSPFTLNLFIVGIIIDNPNQKKLGGQDIFMTBEQKYYNAMKLGSKKPKQPIPRPLNKYQGFIPDITVKQAFDVTIMFLICLNMTVMVETDDQSPEKINTL	1560
hH1	EYNLYMYIYFVIFIFGSPFTLNLFIVGIIIDNPNQKKLGGQDIFMTBEQKYYNAMKLGSKKPKQPIPRPLNKYQGFIPDITVKQAFDVTIMFLICLNMTVMVETDDQSPEKINTL	
hNbR1	EYNLYMYIYFVIFIFGSPFTLNLFIVGIIIDNPNQKKLGGQDIFMTBEQKYYNAMKLGSKKPKQPIPRPLNKYQGFIPDITVKQAFDVTIMFLICLNMTVMVETDDQSPEKINTL	
hB1	AKINLLFVAIPTGECIVKLAALRHYYFTNSWNIPDFVVVILSIGTVLSDIQKYFSPPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIRTLFALMMSLPALFNIGLLFLVMFIYSIFGMAF	1561
hH1	AKINLLFVAIPTGECIVKLAALRHYYFTNSWNIPDFVVVILSIGTVLSDIQKYFSPPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIRTLFALMMSLPALFNIGLLFLVMFIYSIFGMAF	
hNbR1	AKINLLFVAIPTGECIVKLAALRHYYFTNSWNIPDFVVVILSIGTVLSDIQKYFSPPTLFRVIRLARIGRILRLIRGAKGIRTLFALMMSLPALFNIGLLFLVMFIYSIFGMAF	
hB1	YVYKWEAGIDDMFNFQTFANSMLCLFQITTSAGWDGLSPILNTGPYCDPTLPNSNGSRGDCGSPAVGILFFFTYIIISPLIVVNMIAIILENFSVATEESTEPLEDDFDMFYBIWEK	1800
hH1	YVYKWEAGIDDMFNFQTFANSMLCLFQITTSAGWDGLSPILNTGPYCDPTLPNSNGSRGDCGSPAVGILFFFTYIIISPLIVVNMIAIILENFSVATEESTEPLEDDFDMFYBIWEK	
hNbR1	YVYKWEAGIDDMFNFQTFANSMLCLFQITTSAGWDGLSPILNTGPYCDPTLPNSNGSRGDCGSPAVGILFFFTYIIISPLIVVNMIAIILENFSVATEESTEPLEDDFDMFYBIWEK	
hB1	FDPEATQFIEYSVLSDFADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRIHRMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEBKMAANPSKISIEYPTITTLRRKHBEVSAMVIQRAFRRHLLQRS	1920
hH1	FDPEATQFIEYSVLSDFADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRIHRMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEBKMAANPSKISIEYPTITTLRRKHBEVSAMVIQRAFRRHLLQRS	
hNbR1	FDPEATQFIEYSVLSDFADALSEPLRIAKPNQISLINMDLPMVSGDRIHRMDILFAFTKRVLGESGEMDALKIQMEBKMAANPSKISIEYPTITTLRRKHBEVSAMVIQRAFRRHLLQRS	
hB1	LKHASFLRQQAGSGLSBEDAPERBGLIAYVMSENFSRPLGPPSSSISSTSPPSYDSVTRATSDNLQVRGSDYSHSEDLADFPSPDRDRESIV	2016
hH1	LKHASFLRQQAGSGLSBEDAPERBGLIAYVMSENFSRPLGPPSSSISSTSPPSYDSVTRATSDNLQVRGSDYSHSEDLADFPSPDRDRESIV	
hNbR1	LKHASFLRQQAGSGLSBEDAPERBGLIAYVMSENFSRPLGPPSSSISSTSPPSYDSVTRATSDNLQVRGSDYSHSEDLADFPSPDRDRESIV	

Fig. 1 Amino acid sequences of human Nav1.5 Na⁺ channel

For comparison, differences from the human heart (hH1) and human neuroblastoma cells (hNbR1) Nav1.5 Na⁺ channels are shown below the sequence with *. Predicted transmembrane regions are boxed. Underlined letters in hB1 indicate the amino acids encoded by exon24, the alternative splicing exon of Nav1.5/SCN5A.

2.2 脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因第 24 外显子的选择性剪接

包含第 24 外显子的引物 P13 进行 PCR 反应后, 琼脂糖凝胶电泳结果显示有 2 条带(图 1), 分别纯化后行克隆测序, 发现是第 24 外显子的选择性剪接, 第 24 外显子共有 54 个碱基, 参与编码 18 个氨基酸(图 2a), 其中包含第 24 外显子的选择

性剪接体命名为 hB1, 另一条选择性剪接体则命名为 hB2. RT-PCR 结果显示, 2 种选择性剪接体在成人和鼠脑组织中基本同时表达, 表达比率接近 1:1, 人和鼠 Nav1.5/SCN5A 基因的第 24 外显子共有 4 个不同碱基, 却产生相同的氨基酸序列(图 2b).

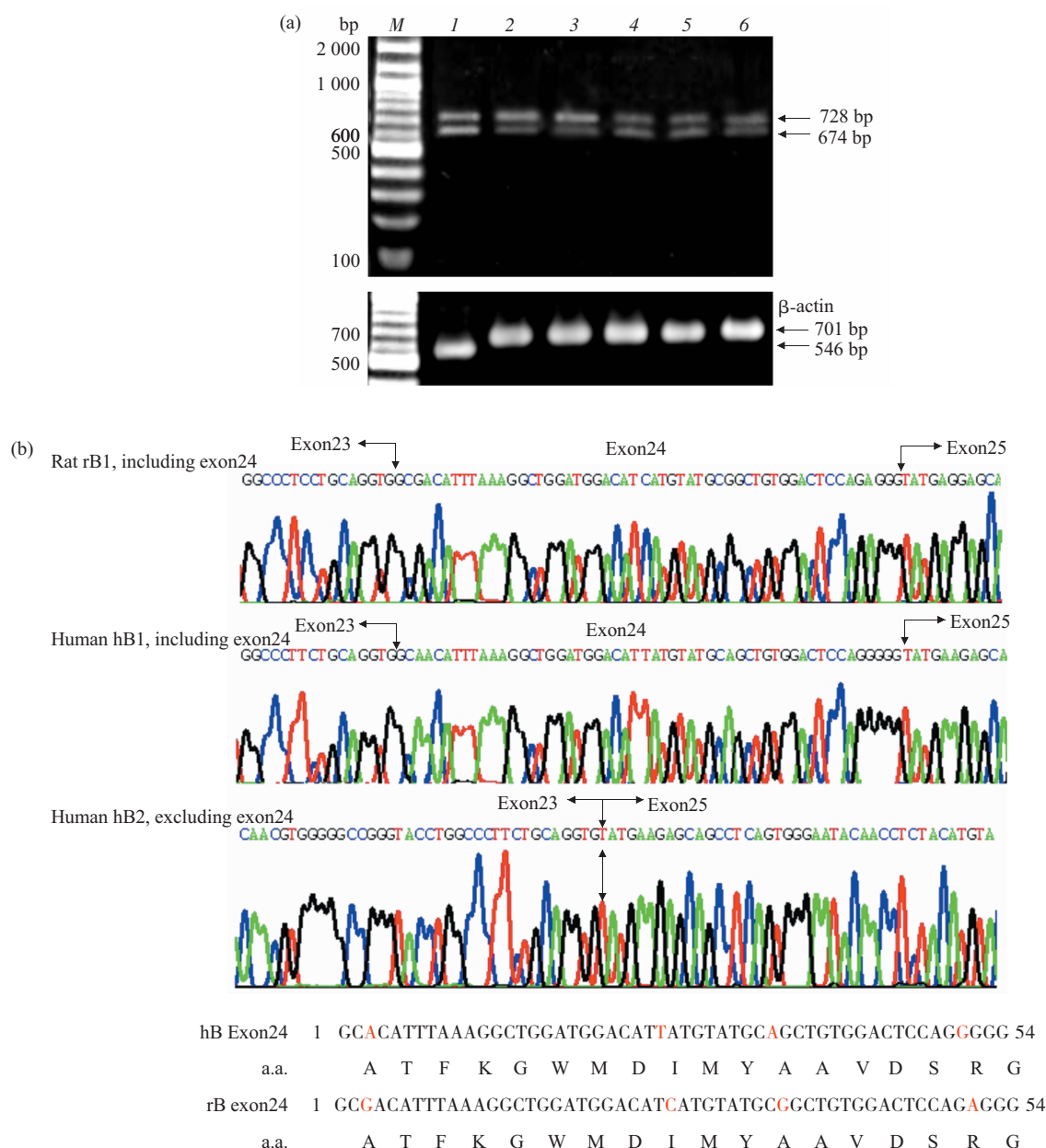


Fig. 2 Expression patterns (a) and sequence analysis (b) of the two variants in human and rat brain

(a) M: Marker. 1: Human brain (adult). 2: Rat brain (postnatal day 1). 3: Rat brain (postnatal days 9). 4: Rat brain (postnatal days 40). 5: Rat brain (postnatal days 80). 6: Rat brain (postnatal days 120). (b) ↑: Alternative splicing site of exon24. a.a.: Amino acid sequences encoded by exon24, red color letters in the exon24s indicate the different nucleotides between human (hB) and rat (rB).

2.3 第 24 外显子的基因定位

人 Nav1.5/SCN5A 基因定位于染色体 3P21 区, 全长约 83 kb, 有 28 个外显子, 其中第 24 外显子

的序列最短, 仅有 54 个碱基(图 3), 参与编码产生的 18 个氨基酸都位于 Nav1.5 钠通道 α 亚单位 DⅢ 结构域 S5 与 S6 之间的环(loop)上 (图 4).

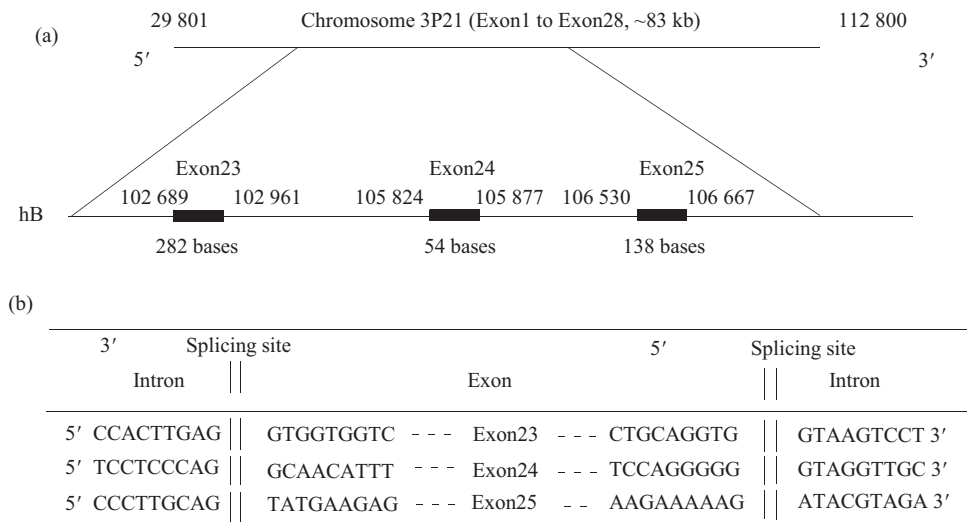


Fig. 3 Location of exon24 in the human Nav1.5/SCN5A genome
(a) Location of exon23, exon24 and exon25 in the human Nav1.5 genome. (b) Different intron-exon boundaries of Nav1.5/SCN5A from exon23 to exon25.

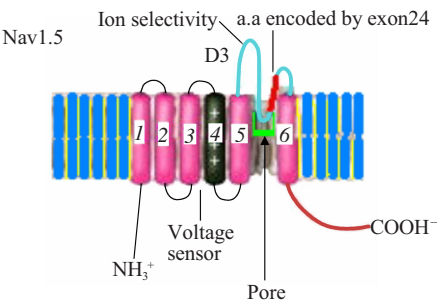


Fig. 4 The region encoded by exon24 in human Nav1.5 channel
1~6: Domain S1~S6 of Nav1.5. Red color line between S5 and S6 indicate the region encoded by exon24, the transmembrane region of the channel to form a narrow and ion-selective filter at the extracellular end of the pore.

2.4 非脑组织中 2 种选择性剪接体的表达及表达比率

RT-PCR 法对成鼠全身组织中的 2 种选择性剪接体(hB1 和 hB2)进行检测发现, 心脏、肺脏、睾丸和骨骼肌组织中均可见 2 种选择性剪接体的表达, 竞争性 PCR 显示 2 种选择性剪接体表达比率不同, 心脏中可见二者的表达, 表达比率接近 4 : 1, 与二者在脑组织中的表达不同, 肺脏和骨骼肌组织中 2 种选择性剪接体的表达比率接近 1 : 1,

而肝脏和肾脏中未包含第 24 外显子选择性剪接体的表达值却非常低(图 5).

2.5 2 种选择性剪接体在不同周龄大鼠心脑组织中的表达

对 5 个不同发育周期 Wistar 大鼠(P1, P9, P40, P80, P120) 心脑组织中 2 种选择性剪接体的表达进行竞争性 PCR 检测, 发现随着年龄的增加, 脑组织中 2 种选择性剪接体表达比率基本不变(图 2), 但心脏中未包含第 24 外显子的选择性剪接体表达逐渐增加, 而包含第 24 外显子的选择性剪接体表达基本不变, 但总体表达仍以包含第 24 外显子的选择性剪接体为主(图 6).

2.6 Nav1.5 Na⁺通道在 Wistar 大鼠全身各组织中的分布

利用 RT-PCR 法 Wistar 成鼠(P80)全身 16 种组织中 Nav1.5/SCN5A 基因 mRNA 进行检测发现, Wistar 大鼠全身 16 种组织中均可检测到 Nav1.5/SCN5A 基因 mRNA 的表达, 但不同组织中 Nav1.5/SCN5A 基因 mRNA 的表达高低不同, 其中以心肌组织中的表达为最高, 脑组织和睾丸组织次之, 脊髓、肝、肺、脾、骨骼肌、胃、小肠、大肠、肾上腺和膀胱中低表达(图 7), 说明 Nav1.5 Na⁺通道在全身组织中分布广泛.

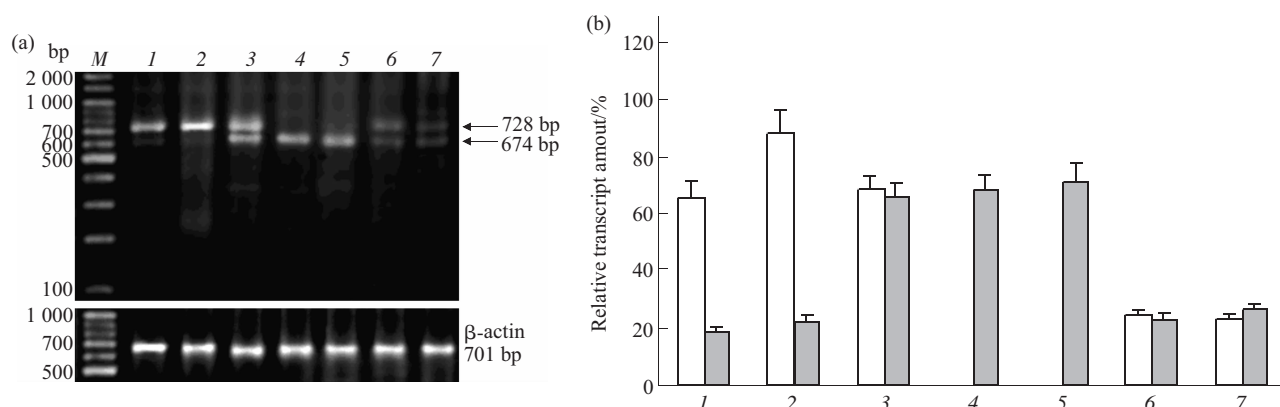


Fig. 5 Expression patterns of the two variants in different tissues of rat

M: Marker. For normalization of the amount of different cDNAs we used β -actin as an internal standard. Data of gene expression value are presented as $(\bar{x} \pm s)$. For number of measurements see **Materials and methods**. 1: Rat testis, lower expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(65.25 \pm 6.14)\%$), shorter variant (expression value: $(18.25 \pm 2.11)\%$)). 2: Rat heart, lower expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(88.24 \pm 7.82)\%$), shorter variant (expression value: $(21.96 \pm 2.33)\%$)). 3: Rat brain, parallel expression of the two variants (longer variant (expression value: $(68.46 \pm 4.11)\%$), shorter variant (expression value: $(65.18 \pm 5.86)\%$)). 4: Rat liver, very low expression of the longer variant (longer variant (expression value near 0), shorter variant (expression value: $(68.34 \pm 5.61)\%$)). 5: Rat kidney, very low expression of the longer variant (longer variant (expression value near 0), shorter variant (expression value: $(70.88 \pm 6.91)\%$)). 6: Rat lung, parallel expression of the two variants (longer variant (expression value: $(24.28 \pm 2.19)\%$), shorter variant (expression value: $(22.75 \pm 2.13)\%$)). 7: Rat skeletal muscle, parallel expression of the two variants (longer variant (expression value: $(23.24 \pm 1.15)\%$), shorter variant (expression value: $(25.64 \pm 2.38)\%$)). □: Longer variant (including exon24); ■: Shorter variant (excluding exon24).

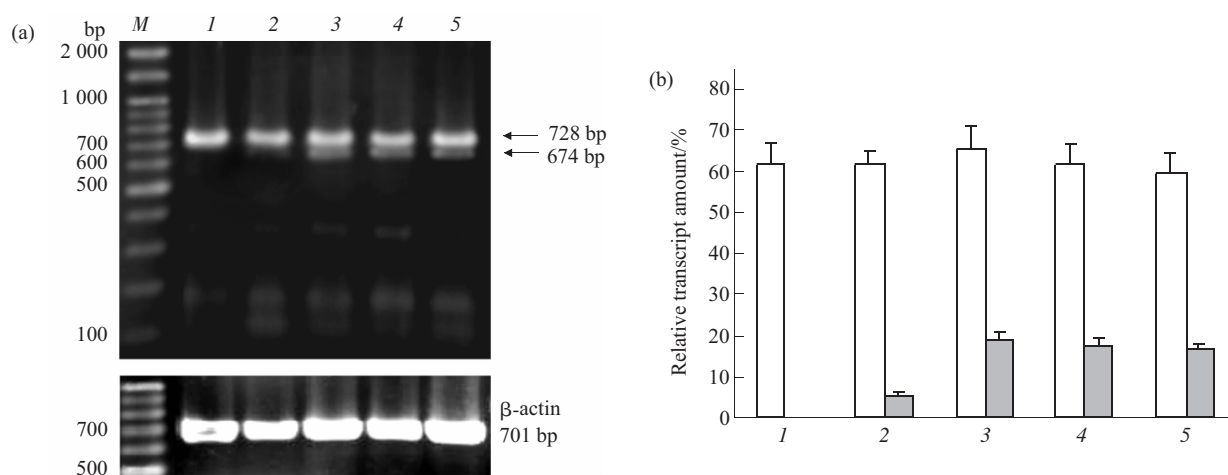


Fig. 6 Expression patterns of the two variants in rat heart at different postnatal days

M: Marker. For normalization of the amount of different cDNAs we used β -actin as an internal standard. Data of gene expression value are presented as $(\bar{x} \pm s)$. For number of measurements see **Materials and methods**. 1: Rat heart (postnatal day 1), no expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(61.27 \pm 5.44)\%$), shorter variant (expression value: 0)). 2: Rat heart (postnatal days 9), lower expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(60.44 \pm 4.65)\%$), shorter variant (expression value: $(5.23 \pm 0.61)\%$)). 3: Rat heart (postnatal days 40), moderate expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(65.42 \pm 5.64)\%$), shorter variant (expression value: $(18.78 \pm 1.66)\%$)). 4: Rat heart (postnatal days 80), moderate expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(61.22 \pm 5.68)\%$), shorter variant (expression value: $(17.28 \pm 1.56)\%$)). 5: Rat heart (postnatal days 120), moderate expression of the shorter variant (longer variant (expression value: $(59.49 \pm 4.85)\%$), shorter variant (expression value: $(16.28 \pm 1.62)\%$)). □: Longer variant (including exon24); ■: Shorter variant (excluding exon24).

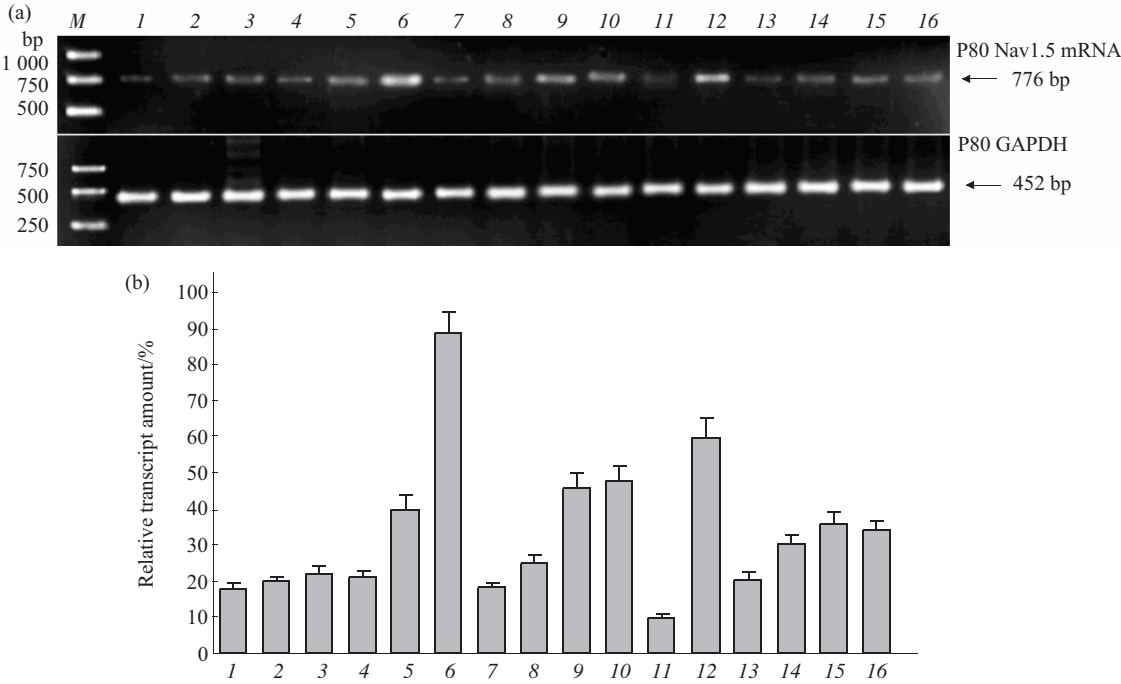


Fig. 7 Expression of Nav1.5/SCN5A in different rat tissues

M: Marker. For normalization of the amount of different cDNAs we used GAPDH as an internal standard. Data of gene expression value are presented as ($\bar{x} \pm s$). For number of measurements see **Materials and methods**. 1: Cerebral cortex ((18.42±0.98)%). 2: Cerebellum ((20.12±1.21)%). 3: Hippocampus ((22.42±1.86)%). 4: Brain stem ((21.18±1.48)%). 5: Spinal cord ((40.36±4.01)%). 6: Heart ((88.68±6.52)%). 7: Liver ((18.64±1.13)%). 8: Kidney ((24.88±2.17)%). 9: Spleen ((46.22±3.87)%). 10: Lung ((48.11±4.03)%). 11: Pancreas ((10.34±0.87)%). 12: Testis ((60.13±5.86)%). 13: Skeletal muscle ((21.12±1.76)%). 14: Stomach ((30.22±2.87)%). 15: Adrenal gland ((36.42±2.87)%). 16: Bladder ((34.12±2.57)%).

3 讨 论

Nav1.5 Na⁺通道是心肌的特异性 Na⁺通道, 尽管已有研究发现中枢神经系统中存在 Nav1.5/SCN5A 基因 mRNA 的表达^[3,6,8], 但我们首次全序克隆人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA. 该基因 cDNA 有 2 种变构体, 命名为 hB1 和 hB2, 其中 hB1 全长 6 201 个碱基, 参与编码 2 016 个氨基酸, 和人心肌 Nav1.5 Na⁺通道氨基酸序列相同率高达 98%, 共有 28 个不同氨基酸, 其中的 7 个集中位于第 6A 和第 6 外显子编码区, 提示第 6A 和第 6 外显子的选择性剪接可能会对 Nav1.5 Na⁺通道的功能产生重要影响, 而且我们既往研究已发现第 6A 外显子具有参与编码神经系统 Nav1.5 Na⁺通道的特异性, 而第 6 外显子参与编码非神经系统 Nav1.5 Na⁺通道, Nav1.5/SCN5A 基因的不同外显子参与编码不同系统 Nav1.5 Na⁺通道的机制尚不清楚, 可能与不同类型 Nav1.5 Na⁺通道的组织特异性有关, 所以第 6A 外显子和第 6 外显子的选择性剪接机制及

对 Nav1.5 Na⁺通道功能的影响值得深入研究^[2,3]. 与人神经母细胞瘤 Nav1.5 Na⁺通道氨基酸序列相比, 二者有 20 个不同氨基酸, 提示同一系统该离子通道的同源性更高.

在对人脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因 cDNA 的克隆中, 我们没有发现该基因第 18 外显子的选择性剪接, 却发现其第 24 外显子的选择性剪接(hB2), 这与心肌 Nav1.5/SCN5A 基因不同. 为推测第 24 外显子的选择性剪接对脑组织 Nav1.5 钠通道结构和功能的影响, 我们对第 24 外显子编码的氨基酸序列在 Nav1.5 钠通道上的位置进行了分析, 结果显示: 第 24 外显子参与编码产生的氨基酸位于 Nav1.5 钠通道 α 亚单位 DⅢ结构域 S5 与 S6 之间的环(loop)上, 该部位是离子选择的关键部位, 参与组成离子跨膜转运通道的核心(pore, 图 4)决定着离子的跨膜转运, 所以推测第 24 外显子的选择性剪接可能对脑组织 Nav1.5 钠通道的功能有重要影响, 但确切的结果有待于膜片钳实验来验证. 既

往研究认为,不同类型的 Na^+ 通道具有不同的电生理学特性,主要原因是由于不同的基因参与编码^[9,10],但对于同种类型 Na^+ 通道不同选择性剪接体之间功能差异的研究却较少,本实验以及我们既往的研究提示同种类型 Na^+ 通道功能的不同可能主要与同一基因的选择性剪接有关。

此外,本实验还研究了2种选择性剪接体在大鼠全身不同组织中的表达情况,结果显示,脑组织中2种选择性剪接体基本同时表达,表达比率接近1:1,且随着年龄的增加,二者的表达比率基本不变,提示2种选择性剪接体在脑组织中的表达基本稳定。心、肺、睾丸、骨骼肌组织中也可见2种选择性剪接体的表达,但表达趋势与2种选择性剪接体在脑组织中的表达趋势明显不同,在幼鼠(P1)心肌中仅发现长选择性剪接体的表达,随着周龄的增加,短选择性剪接体的表达逐渐增加,至成鼠(P40, P80)时表达基本稳定,但其表达水平仍低于前者,二者表达比率接近4:1,说明心肌中以包含第24外显子的选择性剪接体的表达为主。成鼠睾丸、肺脏和骨骼肌组织中虽可见选择性剪接体的表达,但表达趋势也不相同,骨骼肌和肺脏组织中二者的表达比率接近1:1,与二者在脑组织中的表达比率类似,但二者在骨骼肌和肺脏中的表达值低于二者在脑组织中的表达值,睾丸组织中以长选择性剪接体的表达为主,二者的比率接近4:1,与二者在心肌组织中的表达类似,大鼠肝脏和肾脏组织中主要发现短选择性剪接体的表达,表明这2种选择性剪接体在不同组织中的表达趋势不同,提示这2种选择性剪接体的表达具有组织特异性,说明第24外显子的选择性剪接可能对Nav1.5钠通道的功能产生重要影响。

既往研究已经发现,Nav1.5/SCN5A基因的mRNA也可以在心肌之外的其他组织中表达^[1~5,8~10],为此,我们进行了更加深入的研究,分析了Nav1.5/SCN5A基因mRNA在Wistar大鼠全身16种组织中的表达情况,结果发现,所有组织中均能检测到该基因mRNA的表达,但以心肌中的表达最高,且随着年龄的增加,其mRNA表达值也随之升高,脑组织中该基因mRNA的表达值也较高,但在中枢神经系统的不同部位,其表达高低不同,以海马和脑干中的表达最高,提示Nav1.5 Na^+ 通道在中枢神经系统的不同部位分布不同,值得一提的是,睾丸组织中该基因mRNA的表达值也很高,有研究认为睾丸组织的Nav1.5 Na^+ 通道

可能参与精子的生成和受精等过程^[1]。其余组织中该基因mRNA的表达相对较低,以上结果说明Nav1.5 Na^+ 通道在全身各组中的分布十分广泛,这为Nav1.5 Na^+ 通道病的研究提供了基础。

既往对人心肌Nav1.5 Na^+ 通道的研究发现, Na^+ 通道和细胞电活动密切相关,许多先天性心肌异常电活动,如长QT综合征,Brugada综合征等,是由于心肌Nav1.5 Na^+ 通道基因突变所致^[3, 10~16],而且临床上已有许多癫痫综合征,如全身泛化性癫痫伴发热综合征(GEFS+)等,被证明和 Na^+ 通道基因突变有关^[11,12,15~18],所以目前神经系统中对Nav1.5 Na^+ 通道研究较多的是探讨该离子通道和癫痫的关系。由于Nav1.5 Na^+ 通道广泛地分布于人脑组织的边缘系统,而边缘系统又是癫痫的常发部位,所以提示该通道和癫痫关系密切^[2, 3, 15, 16],但目前尚没有脑组织Nav1.5/SCN5A基因突变所致癫痫的报道。由于从 Na^+ 通道基因突变到癫痫发生的整个过程十分复杂,不仅涉及到细胞电生理功能的改变,还涉及到受体配体的调控,信号转导途径的异常等多个方面,加之Nav1.5 Na^+ 通道在正常神经元电活动中所起的作用大小也不明了,所以探讨Nav1.5 Na^+ 通道和癫痫的关系只是刚刚开始,需要更加深入的研究^[11~16]。

致谢 感谢中国医科大学生物化学与分子生物学教研室于秉治教授和中国医科大学药理学教研室李金鸣教授对本文初稿的审阅及对本课题的一直关注,感谢中国医科大学生物化学与分子生物学教研室惠达美教授、关一夫教授、邢伟教授对本实验给予的指导,感谢中国医科大学附属一院神经外科姚长义教授、李光宇副教授和中国医科大学遗传学教研室赵彦艳教授对本实验的帮助和指导,感谢中国医科大学设备处全体老师对本实验的帮助和指导。

参 考 文 献

- 1 Candenas L, Seda M, Noheda P, *et al.* Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha and beta subunit mRNAs in human tissues. *Eur J Pharmacol*, 2006, **541** (1~2): 9~16
- 2 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. *Eur J Neurosci*, 2005, **22** (4): 793~801
- 3 王军, 宗志红, 欧绍武, 等. 编码脑组织Nav1.5钠通道新外显子的克隆、鉴定和分布. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34** (3): 255~259
Wang J, Zong Z H, Ou S W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34** (3): 255~259

- 4 Yu F H, Yarov-Yarovoy V, Gutman G A, *et al.* Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*, 2005, **57** (4): 387~395
- 5 Chen X, Johnston D. Voltage-gated ion channels in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Pflugers Arch*, 2006, **453** (3): 397~401
- 6 Lai H C, Jan L Y. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci*, 2006, **7** (7): 548~562
- 7 Kerr N C, Holmes F E, Wynick D. Novel isoforms of the sodium channels Nav1.8 and Nav1.5 are produced by a conserved mechanism in mouse and rat. *J Biol Chem*, 2004, **279** (23): 24826~24833
- 8 Mechaly I, Scamps F, Chabbert C, *et al.* Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha subunits expressed in neuronal and non-neuronal excitable cells. *Neuroscience*, 2005, **130** (2): 389~96.
- 9 Yu F H, Catterall W A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*, 2003, **4** (3): 207.1~207.7
- 10 Raymond C K, Castle J, Garrett-Engle P, *et al.* Expression of alternatively spliced sodium channel alpha-subunit genes. Unique splicing patterns are observed in dorsal root ganglia. *J Biol Chem*, 2004, **279** (44): 46234~46241
- 11 Waxman S G. Channel, neuronal and clinical function in sodium channelopathies: from genotype to phenotype. *Nat Neurosci*, 2007, **10** (4): 405~409
- 12 Stafstrom C E. Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr*, 2007, **7** (1): 15~22
- 13 Berkovic S F, Mulley J C, Scheffer I E, *et al.* Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci*, 2006, **29** (7): 391~397
- 14 George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest*, 2005, **115** (8): 1990~1999
- 15 Meisler M H, Kearney J A. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*, 2005, **115** (8): 2010~2017
- 16 Kohling R. Voltage-gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia*, 2002, **43** (11): 1278~1295
- 17 Lopez-Santiago L F, Pertin M, Morisod X, *et al.* Sodium channel beta2 subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain. *J Neurosci*, 2006, **26** (30): 7984~7994
- 18 Yu E J, Ko S H, Lenkowski P W, *et al.* Distinct domains of the sodium channel beta3-subunit modulate channel-gating kinetics and subcellular location. *Biochem J*, 2005, **392** (Pt 3): 519~526

Nav1.5 Na⁺ Channels in Human Brain Are Encoded by New Variants of Nav1.5/SCN5A *

OU Shao-Wu^{1)**,**}, ZONG Zhi-Hong^{2)**}, WANG Jun¹⁾, WANG Yun-Jie¹⁾

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

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

Abstract Tetrodotoxin-resistant Nav1.5 Na⁺ channel has been considered as the cardiac sodium channel. Na⁺ currents with tetrodotoxin resistance (TTX-R) and Nav1.5/SCN5A mRNA have been observed in neurons, but the cDNA encoding the TTX-R Nav1.5 Na⁺ channels in human central nervous system (CNS) has not been identified. Nav1.5/SCN5A cDNA was first cloned from human brain cortex by using RT-PCR method. Two variants of Nav1.5/SCN5A were found and tentatively named hB1 and hB2. Full sequence of cDNA encoding the α -subunit of TTX-R Nav1.5 Na⁺ channel in human brain cortex was 6 201 nucleotides long and was designated hB1. The longest open reading frame of hB1 (accession number EF629346) encodes 2 016 amino acid residues. Sequence analysis has indicated that hB1 is highly homologous with human cardiac Nav1.5/SCN5A with >98% amino acid identity. There are 28 different amino acids between them, with 7 of which locating in the region encoded by exon6A or exon6. Alternative splicing of exon18 was not found in the gene cloning of human brain Nav1.5/SCN5A, which was different from human heart Nav1.5/SCN5A, but a novel alternative splicing lacking exon24 was first found. The two variants were detected in similar ratio in brain, but they were proved to relate to age development in heart tissue. The exon24 of human Nav1.5/SCN5A has 54 nucleotides, encoding 30 amino acid residues, and are located in human chromosome 3P21. This alternative splicing was also found in other tissues other than heart and brain. The expression pattern of the two variants in different tissues was different when detected by competitive PCR method and it was also changing with age development. Furthermore, Nav1.5/SCN5A mRNA was detected in 16 different tissue types of Wistar rats (P80) by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). These results suggest that Nav1.5 Na⁺ channels in human brain are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A and its mRNA is more widely expressed than previously thought. The study is useful for making further investigation in the functional analysis of Nav1.5 Na⁺ channels in different tissues.

Key words Nav1.5/SCN5A, gene cloning, alternative splicing, brain cortex

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

** These two authors contributed to this paper equally.

***Corresponding author . Tel: 86-24-83283385, 86-24-83283396, E-mail: cmuoushaowujp@msn.com

Received: June 25, 2007 Accepted: August 17, 2007