

编码脑组织 Nav1.5 钠通道新 外显子的克隆、鉴定和分布*

王 军¹⁾ 宗志红²⁾ 欧绍武^{1)**} 王运杰¹⁾ 任成涛¹⁾ 林 毅¹⁾ 孟晓娜²⁾

(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 Nav1.5 电压-门控钠通道 (VGSC) 被认为是心肌的特异性通道, 但最近的研究发现, 该通道在脑组织尤其是边缘系统中亦广泛分布. 此前, 在对人神经母细胞瘤细胞钠通道的基因克隆中, 发现 Nav1.5/SCN5A 基因的第 6A 外显子参与编码该通道. 采用人及鼠脑组织, 通过 RT-PCR 法对 Nav1.5 钠通道基因进行克隆发现: Nav1.5/SCN5A 基因中的第 6A 外显子参与编码了该通道, 而心肌等其他组织却是第 6 外显子参与编码该通道. 人 Nav1.5/SCN5A 基因的第 6A 和第 6 外显子都定位于 3 号染色体, 共有 92 个碱基, 都可以编码产生 30 个氨基酸, 但却有 7 个氨基酸不同. 人和鼠脑组织 Nav1.5/SCN5A 基因的第 6A 外显子仅有一个碱基不同, 却产生相同的氨基酸序列. RT-PCR 证实第 6A 外显子在鼠脑的不同部位表达不同, 第 6 外显子在大鼠不同组织中的表达也不同, 这为深入研究不同系统中 Nav1.5 钠通道的功能提供了基础.

关键词 第 6A 外显子, 第 6 外显子, 基因克隆, Nav1.5 钠通道, 脑组织

学科分类 Q71

电压-门控 Na⁺ 通道 (VGSC) 有一个可以单独发挥作用的 α 亚单位和 1~4 个起辅助作用的 β 亚单位构成, 在人类已有 9 个 Na⁺ 通道 α 亚单位被成功克隆^[1,2]. 其中对河豚毒不敏感 (TTX-R) 的 Nav1.5 钠通道被认为是心肌的特异性通道^[1~3], 但最近的研究发现这种通道广泛地分布于全身各组织, 除心肌中有极高的分布外, 脑组织尤其是边缘系统中也有很高的分布^[2~6]. 在对人神经母细胞瘤 Nav1.5 钠通道的基因克隆中, 我们首次发现 Nav1.5/SCN5A 基因的第 6A 外显子参与编码该通道^[1], 这与参与编码心肌 Nav1.5 钠通道的第 6 外显子明显不同, 为探讨是第 6A 还是第 6 外显子参与编码脑组织 Nav1.5 钠通道, 我们对人脑和大鼠脑组织 Nav1.5 钠通道进行了基因克隆, 并研究了第 6 和第 6A 外显子参与编码大鼠全身组织 Nav1.5 钠通道的情况.

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 (皮质). 健康雄性 Wistar 大鼠 (P30) 由中国医科大学

实验动物中心提供. 总 RNA 提取及 RT-PCR 试剂盒有 Takara (Japan) 公司提供, 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 试剂一步法提取人脑和鼠脑组织总 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、鼠心肌和人神经母细胞瘤 Nav1.5/SCN5A 基因序列 (hH1 (accession nos M77235)、mH1 (accession nos M27902) 和 hNBR1 (accession nos AB158469)) 设计 4 对特异性的扩增第 6 及第 6A 外显子的引物 (表 1) 进行 PCR 反应.

*辽宁省教育厅资助项目 (05L500).

** 通讯联系人. Tel: 024-83283385, 024-83283396

E-mail: cmuouhaowujp@msn.com

收稿日期: 2006-12-31, 接受日期: 2007-02-07

Table 1 Sequences of primers used for the amplification of Nav1.5 channel in human or rat brain

Primers	Forward	Reverse	Length/bp
E1	5' GGCAACGTGAGGAGAGCCTGT 3'	5' AGGTCCAGGGGATTCCCAGACCA 3'	959
E2	5' AAAACTAGGCAATTTGTCGG 3'	5' CGATGAGGGCAAAGACG 3'	174
E3	5' TCTCAGCCTTACGCACCTT 3'	5' GCCTCCACGGAACCATT 3'	244
E4	5' CCCTTCCACCCAGTTCG 3'	5' TGCCCAGGTCCACAAAT 3'	294
E5	5' GCCAACCGTGAAAAGATG 3'	5' CCAGGATAGAGCCACCAAT 3'	701

E1: Amplification of gene sequences including exon6A in human and rat brain. E2: Amplification of exon6A in human and rat brain. E3: Amplification of exon6 in human brain. E4: Amplification of exon6 in rat brain and other tissues. E5: Primer for β -actin in rat tissues.

1.3 基因克隆

RT-PCR 产物分别经凝胶回收纯化后, 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. 详细步骤见参考文献[1].

2 结 果

2.1 参与编码人和鼠脑组织 Nav1.5 钠通道的是第 6A 外显子而非第 6 外显子

特异性的扩增第 6 及第 6A 外显子的引物 (表 1) 进行 PCR 反应, 结果显示, 人脑和鼠脑组织中有第 6A 外显子的表达而无第 6 外显子的表达 (图 1). RT-PCR 产物纯化后进行克隆测序 (图 2),

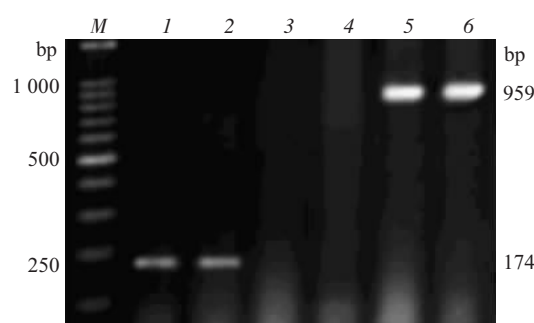
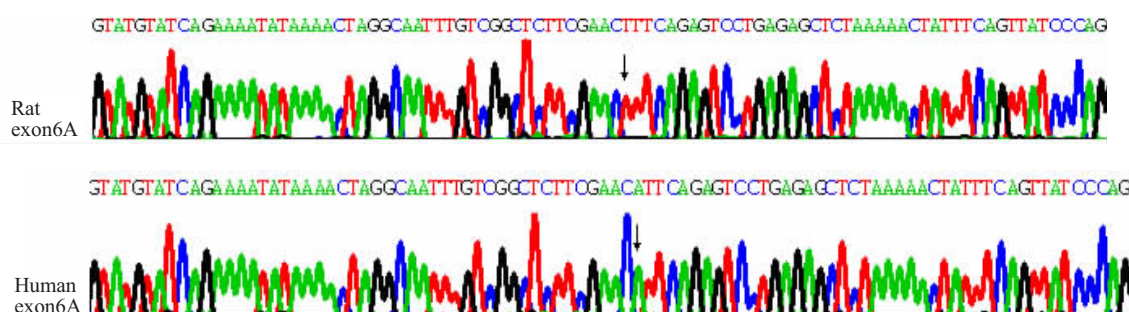


Fig. 1 Expressions of exon6A and exon6 in human and rat brain

M: Marker. 1: Human brain, using primer E2. 2: Rat brain, using primer E2. 3: Human brain, no expression of exon6 using primer E3. 4: Rat brain, no expression of exon6 using primer E4. 5: Human brain, using primer E1. 6: Rat brain, using primer E1.



Exon6A/6:

hB GTATGTATCAGAAAAATATAAACTAGGCAATTTGTCGGCTCTTCGAACATTCAGAGTCCTGAGAGCTCTAAAACTATTTTCAGTTATCCCAG
hNBR1 GTATGTATCAGAAAAATATAAACTAGGCAATTTGTCGGCTCTTCGAACATTCAGAGTCCTGAGAGCTCTAAAACTATTTTCAGTTATCCCAG
mB GTATGTATCAGAAAAATATAAACTAGGCAATTTGTCGGCTCTTCGAACATTCAGAGTCCTGAGAGCTCTAAAACTATTTTCAGTTATCCCAG
hH1 ATACACAACGAATTTGTGGACCTGGGCAATGTCTCAGCCTTACGCACCTCCGAGTCCTCCGGGCCCTGAAAACTATATCAGTCATTTCAG

	S3	S4	
hB a.a	2	YVSENIKLGNI	91
hNBR1 a.a	2	YVSENIKLGNI	91
mB a.a	2	YVSENIKLGNI	91
hH1a.a	2	YTTEFVDLGNV	91

Fig. 2 Gene sequences of exon6A and exon6 and their encoding amino acid sequences

↓: The different base pair between human exon6A and RAT exon6A. hB: cDNA encoding the α subunit of the Nav1.5 in human brain. mB: cDNA encoding the α subunit of the Nav1.5 in rat brain. hH1: cDNA encoding the α subunit of the Nav1.5 in human heart. hNBR1: cDNA encoding the α subunit of the Nav1.5 in human neuroblastoma cells.

再次证明是第 6A 外显子而非第 6 外显子参与编码脑组织 Nav1.5 钠通道. 第 6A 和第 6 外显子都有 92 个碱基, 都可以编码产生 30 个氨基酸, 这些氨基酸都位于 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的 D1-S3-S4 区域, 但两者编码产生的这些氨基酸却有 7 个不相同(图 2). 尽管种属不同, 但参与编码人脑和鼠脑组织 Nav1.5 钠通道的第 6A 外显子仅有一个碱基不同, 且编码后产生的氨基酸序列相同(图 2). 参与编码鼠脑组织和人神经母细胞瘤细胞 Nav1.5 钠通道第 6A 外显子的基因序列完全相同(图 2). RT-PCR 法证实, 第 6A 外显子在成鼠脑的不同部位表达不同, 表达趋势为海马>大脑>脑干>小脑(图 3).

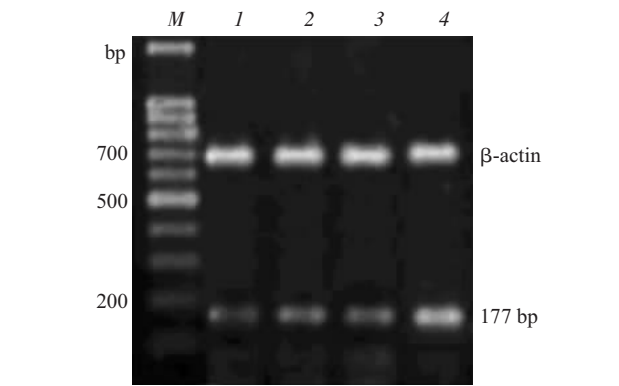


Fig. 3 Expressions of exon6A in different part of the brain
M: Marker; *1*: Expression of exon6A in cerebellum, low expression; *2*: Expression of exon6A in cerebral cortex, moderate expression; *3*: Expression of exon6A in cerebral cortex, moderate expression; *4*: Expression of exon6A in hippocampus, high expression.

2.2 参与编码大鼠其他组织 Nav1.5 钠通道的是第 6 外显子

特异性的扩增大鼠第 6 外显子的引物 E4 和第 6A 外显子的引物 E2 进行 PCR 反应, 结果显示除脑组织外, 大鼠心肌、肺脏、肝脏、骨骼肌和睾丸组织中都有第 6 外显子的表达, 但未发现有第 6A 外显子的表达, 而且不同组织间第 6 外显子的表达高低也不同, 表达趋势为心肌>睾丸>肺脏>骨骼肌>肝脏(图 4).

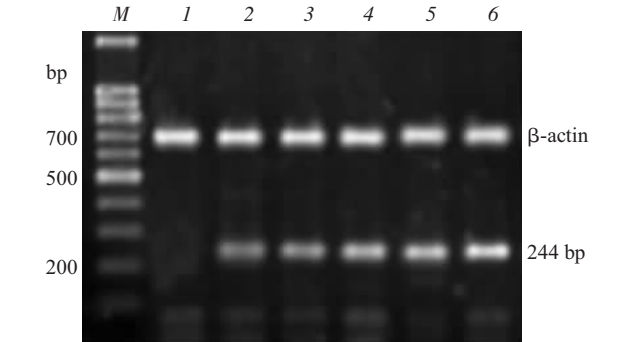


Fig. 4 Expressions of exon6 in rat brain and other tissues using primer E4
M: Marker; *1*: Rat brain tissue, no expression of exon6; *2*: Liver, low expression of exon6; *3*: Skeletal muscle, low expression of exon6; *4*: Lung, moderate expression of exon6; *5*: Testis, high expression of exon6; *6*: Heart, higher expression of exon6.

2.3 第 6A 外显子和第 6 外显子的基因定位

参与编码人心肌 Nav1.5 钠通道的第 6 外显子定位于人 3 号染色体的 Nav1.5/SCN5A 基因区, 因

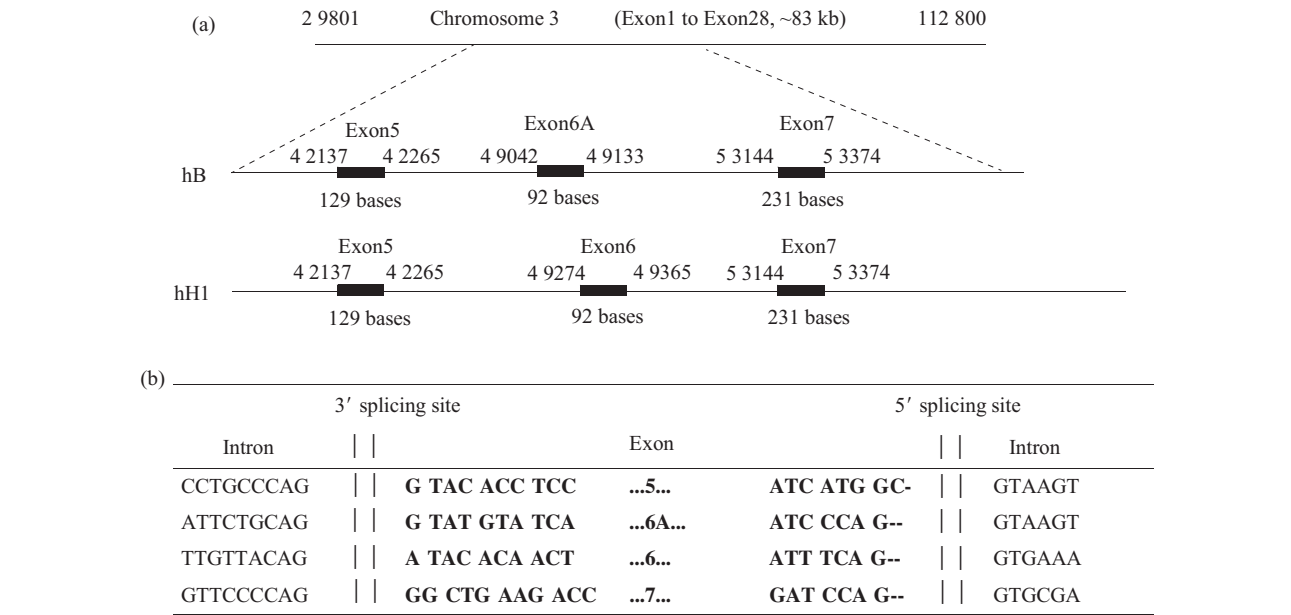


Fig. 5 Partial genomic structure of human SCN5A
(a) Exon 6 encodes the α -subunit of hH1, while of hB is exon6A. (b) Different Intron-exon boundaries of SCN5A from Exon 5 to 7.

cDNA 中连接第 6A 和第 6 外显子两端的外显子相同, 所以第 6A 外显子也定位于该区域(图 5a, b), 同时提示第 6A 外显子和第 6 外显子的选择性剪切也可发生在 Nav1.5/SCN5A 基因中, 因基因定位相同, 所以它们编码产生的氨基酸序列都位于 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的 D1-S3-S4 区域(图 6).

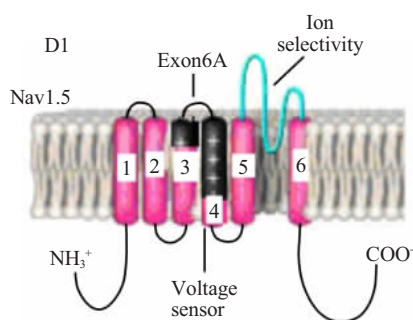


Fig. 6 Regions encoded by exon6A in human Nav1.5 channel

1~6: Domain S1~S6 of Nav1.5. Black color shaded columns indicate regions encoded by exon6A (S3~S4), which is very sensitive to voltage changing.

3 讨 论

对河豚毒不敏感的 Nav1.5 钠通道的研究一直局限于心肌^[1,5,6], 尽管已有研究表明该通道广泛地分布于脑组织中^[1,4,7], 但尚没有心肌和脑组织中 Nav1.5 钠通道编码基因和氨基酸序列不同的报道. 继首次在人神经母细胞瘤细胞 Nav1.5 钠通道的基因克隆中发现第 6A 外显子参与编码该通道以来^[1], 我们再次在人和鼠脑组织 Nav1.5 钠通道的基因克隆中发现了第 6A 外显子, 而且特异性的扩增第 6 及第 6A 外显子的引物进行 PCR 反应, 结果表明脑组织中无第 6 外显子的表达, 而心肌中无第 6A 外显子的表达, 序列分析再次证明参与编码脑组织 Nav1.5 钠通道的是第 6A 外显子, 这与参与编码人和鼠心肌 Nav1.5 钠通道的第 6 外显子明显不同^[1,3,6,8,9]. 鉴于在人脑组织、鼠脑组织和人神经母细胞瘤等神经系统的 Nav1.5 钠通道中只发现有第 6A 外显子的表达, 而其他组织中只发现有第 6 外显子的表达, 所以提示第 6A 外显子有参与编码神经系统 Nav1.5 钠通道的特异性, 而第 6 外显子参与编码非神经系统的 Nav1.5 钠通道, 不同的外显子参与编码不同组织 Nav1.5 钠通道的机制尚不清楚.

对 Nav1.5/SCN5A 基因序列进行分析发现第 6A 外显子位于第 5 和第 6 外显子之间的内含子上,

而且连结第 6A 外显子和第 6 外显子两端的外显子相同, 所以提示这是 Nav1.5/SCN5A 基因的一种选择性剪切现象^[1]. 既往的研究认为, 外显子的选择性剪切可以产生药理学和生理学特性明显不同的变构体^[7,10~12]. 本研究发现第 6A 外显子和第 6 外显子编码产生的氨基酸序列都位于 Nav1.5 钠通道 α 亚单位的 D1-S3-S4 区域, 但编码产生的 30 个氨基酸中, 却有 7 个氨基酸不同, 并且该区域是电压敏感区, 和 Nav1.5 通道的电活动密切相关, 而且我们既往对人神经母细胞瘤 Nav1.5 钠通道进行膜片钳实验发现, 其电流要比心肌 Nav1.5 钠通道电流弱^[1], 这可能和第 6A 外显子和第 6 外显子的选择性剪切有关, 提示不同的外显子参与编码产生的 Nav1.5 钠通道电活动可能不同, 推测人脑组织 Nav1.5 钠通道和心肌 Nav1.5 钠通道的电活动可能不同. 由于人神经母细胞瘤起源于神经嵴, 和神经元高度同源, 并且表现出和神经元高度相似的生物学、药理学和电生理学特性, 所以推测人脑组织 Nav1.5 钠通道和人神经母细胞瘤 Nav1.5 钠通道具有相似的电活动^[1].

此外, 本试验还发现第 6A 外显子在大鼠全脑不同部位的表达也不同, 其中以海马神经元表达最高, 提示该通道在海马神经元的电活动中可能起重要作用, 同样第 6 外显子在大鼠心肌、肺脏、肝脏、骨骼肌和睾丸中都有表达, 表达趋势高低也不同, 提示 Nav1.5 钠通道在不同组织中甚至同一组织中的不同部位分布也不同, 可能与该通道在不同组织中起的作用大小有关. 序列分析发现, 参与编码鼠脑组织和人神经母细胞瘤细胞 Nav1.5 钠通道第 6A 外显子的序列完全相同, 二者和参与编码人脑组织 Nav1.5 钠通道的第 6A 外显子仅有一个碱基不同, 但编码后产生相同的氨基酸序列, 提示参与编码不同种属神经系统 Nav1.5 钠通道的第 6A 外显子高度同源. 第 6A 和第 6 外显子的选择性剪切机制以及其对 Nav1.5 钠通道电活动的影响值得深入研究.

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对本文初稿的审阅及惠达美教授、关一夫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.

参 考 文 献

- 1 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
- 2 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
- 3 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**: 389~396
- 4 Chen Y H, Dale T J, Romanos M A, *et al.* Cloning, distribution and functional analysis of the type III sodium channel from human brain. *Eur j neurosci*, 2000, **12** (12): 4281~4289
- 5 Donahue L M, Coates P W, Lee V H, *et al.* The cardiac sodium channel mRNA is expressed in the developing and adult rat and human brain. *Brain Res*, 2000, **887** (2): 335~343
- 6 Hartmann H A, Colom L V, Sutherland M L, *et al.* Selective localization of cardiac SCN5A sodium channels in limbic regions of rat brain. *Nat Neurosci*, 1999, **2** (7): 593~595
- 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 Meisler M H, Kearney J A. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*, 2005, **115** (18): 2010~2017
- 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 Tan J, Liu Z, Nomura Y, *et al.* Alternative splicing of an insect sodium channel gene generates pharmacologically distinct sodium channels. *J Neurosci*, 2002, **22** (13): 5300~5309
- 11 Goldin A L. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol*, 2001, **63** (1): 871~894
- 12 Celesia G G. Disorders of membrane channels or channelopathies. *Clin Neurophysiol*, 2001, **112** (1): 2~18

Cloning, Distribution and Analysis of The New Exon Encoding Nav1.5 Channel in Brain*

WANG Jun¹⁾, ZONG Zhi-Hong²⁾, OU Shao-Wu^{1)**}, WANG Yun-Jie¹⁾,
REN Cheng-Tao¹⁾, LIN Yi¹⁾, MENG Xiao-Na²⁾

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 Among the tetrodotoxin-resistant(TTX-R) α -subunits, Nav1.5 mRNA showed the strongest expression in the heart, according with its consideration as the cardiac Na⁺ channel. Compared to its mRNA transcription in the heart, the Nav1.5/SCN5A gene was also expressed in high levels in the brain, especially limbic regions of the brain. Exon6A of Nav1.5/SCN5A gene was first found in cloning of Nav1.5 channel in human neuroblastoma cells. It was found that it is exon6A that encodes Nav1.5 channels in human and rat brain while it is exon6 that encodes Nav1.5 channels in other tissues in the cloning of Nav1.5 channel in these tissues, Both exon6A and exon6 have 92 base pairs, which encodes 30 amino acid residues, and are located in human chromosome 3. But these two resulting products differ by 7 amino acid residues. There is only one different base pair between the exon6As encoding Nav1.5 channels in human and rat brain, but their encoding amino acid residues are identical. The expressions of exon6A in different part of the brain are different and the similar result was found in the expressions of exon6 among different tissues of rat when detected by using RT-PCR method. The study is useful for making further investigation in the functional analysis of Nav1.5 channels in different tissues.

Key words exon6A, exon6, gene cloning, Nav1.5 channel, brain tissue

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

**Corresponding author . Tel: 86-24-83283385, 024-83283396 Fax: 86-23-68752315, E-mail: cmuoushaowujp@msn.com

Received: December 31, 2006 Accepted: February 7, 2007