

• 基础研究 •

小 G 蛋白在心肌钠通道蛋白转运中的作用

厦门大学附属第一医院心内科 厦门大学医学院心律失常与心脏电生理实验室 (厦门 361003) 张紫冠 胡 森
陈文博 黄峥嵘 李卫华¹

【摘 要】 目的 研究小 G 蛋白 Sar1 和 Arf1 对钠通道蛋白 (Na_v1.5) 转运的调控作用。方法 以 HEK293 细胞作为宿主细胞, 将人 SCN5A 基因转染到 HEK293 细胞中, 通过 G418 筛选稳定表达 SCN5A 基因的细胞系; 为了检测小 G 蛋白对 Na_v1.5 的调节效应, 野生型或突变型的小 G 蛋白 Sar1 和 ARF1 分别瞬转到 HEK293-Na_v1.5 细胞。利用免疫印迹对目标蛋白进行定量, 应用免疫荧光对细胞内的目标蛋白进行定位。结果 过表达突变的 Sar1 减少了细胞膜上 Na_v1.5 的表达和抑制了 Na_v1.5 转运到细胞膜上。另外, 过表达 ARF1 对于 Na_v1.5 在细胞的表达及定位无明显影响。结论 小 G 蛋白 Sar1 可能参与调节 Na_v1.5 在细胞内的运输。

【关键词】 小 G 蛋白; Sar1; ARF1; SCN5A 基因; Na_v1.5 蛋白

【中图分类号】 R363.1⁺4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2018)06-0114-05

Role of small GTP-binding proteins in cardiac voltage-gated sodium channel transport ZHANG Ziguang, HU Sen, CHEN Wenbo, HUANG Zhengrong, LI Weihua. Arrhythmia and Cardiac Electrophysiology Laboratory, Medical College of Xiamen University; Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of small GTPases Sar1 and Arf1 in the transcription of Na_v1.5 protein. **Methods** In this experiment, we used HEK 293 cells as the host cells to co-express Na_v1.5 with the wild-type (WT) or mutant form of the small GTPases Sar1 and Arf1. Then in order to check the effect that small GTPase had on Na_v1.5 regulation, two techniques were used to analyze the results. Western blot was performed to measure the expression level of Na_v1.5, and Confocal microscopy was used to visualize the cellular localization of Na_v1.5. **Results** We found that mutant forms of Sar1 decreased Na_v1.5 expression level significantly and inhibited its localization at the cell membrane. On the other hand, Arf1 only showed small effect on the expression level and localization of Na_v1.5. **Conclusion** This study provides evidences that Na_v1.5 intracellular transport is regulated by small GTPases Sar1 in particular.

【Key words】 small GTPases; Sar1; ARF1; SCN5A gene; Na_v1.5

Na_v1.5 是由 SCN5A 基因编码的蛋白, 其主要表达在心肌细胞, 编码负责产生心肌钠离子电流的通道, 主要影响心肌动作电位的产生。钠离子通道功能的改变可能导致严重的心律不齐, 甚至猝死^[1-4]。小 G 蛋白在调控蛋白转运过程中发挥重要作用^[5-6]。近年来, 小 G 蛋白对心肌离子通道的调控作用日益受到重视, 目前相关的研究主要集中在钾离子通道和钙离子通道的调控方面, 迄今鲜见有关小 G 蛋白通过调控囊泡运输影响心肌钠离子通道表达和功能的文献报道。本文将在异体细胞 (稳定表达 Na_v1.5 的 HEK293T 细胞), 通过分离细胞膜蛋白 (Western blot) 和定位 (confocal), 研究小

G 蛋白 ARF1 和 Sar1 对钠通道蛋白转运的调控。

1 材料与方法

1.1 材料: HEK293 细胞购自美国 ATCC 公司。带有 G418 筛选抗性的人源 SCN5A 质粒, 含有人 Sar1 和 ARF1 小 G 蛋白野生型 (WT) 和突变型的表达质粒 (pcDNA3.1), 由本实验室通过逆转录 PCR 和定点突变完成, 并经测序验证。凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司。质粒提取试剂盒, 美国 Omega 公司; FuGENE6 脂质体转染试剂, 美国 Promega 公司; Lipotamine2000 脂质体转染试剂, 美国 Life Science 公司; Western blotting 凝胶配制试剂, 江

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2015J01563)

¹ 通信作者, Email: liweihuaxm@hotmail.com

苏碧云天生物技术研究;膜蛋白提取试剂盒,美国 Pierce 公司;APC 标记的 Flag 一抗,日本 MBL 公司;其余常用试剂购自上海生工生物工程股份有限公司。 $\text{Na}_v1.5$ 抗体购于 Alomone, ASC-005, 1:50;内质网 marker Calnexin 抗体购于三鹰, 1:50。

1.2 细胞相关实验:

1.2.1 细胞的培养和传代: HEK293 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素)中,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。传代时弃培养基,用 PBS 洗 3 次,加入适量胰酶消化细胞,室温消化 1 min 左右,加入等量含 10% FBS DMEM 培养基终止消化,根据实验要求将一定数目细胞接种到细胞培养板或细胞培养盘中。待细胞贴壁后,在指定的时间后收蛋白或提 RNA。

1.2.2 细胞稳定转染:为了获得稳定过表达 $\text{Na}_v1.5$ 的 HEK293 细胞株,采用 FuGENE6 转染 HEK293 细胞,转染步骤参照说明书。待细胞密度达到 70% 左右时用于转染。按 FuGENE6:DNA=3:1 比例,将 6 g DNA 加入稀释的 FuGENE6 中。转染后 24 h,用 4 g/mL 嘌呤霉素(Puromycin)处理 HEK293 细胞;每 2~3 天换液;3 周左右即可长到肉眼可见大小的克隆,将克隆转至 24 孔板;待细胞长满后,转移至 6 孔板中培养,加入抗性培养基筛选稳定表达克隆,剩余细胞于 -80 °C 保存备用。

1.2.3 细胞瞬时转染:转染步骤参照试剂说明书。根据实验需要将一定数目 HEK293 细胞分至相应规格的培养板或培养皿中,待细胞密度达 70% 左右后用于转染;用 Opti-MEM 稀释转染试剂 Lipofectamine 2000 和质粒;将稀释好的质粒加入到稀释的脂质体中,轻轻混匀,室温作用 18 min;期间,将待转染的细胞用 PBS 洗一次,然后换为新鲜的 DMEM;20 min 后将混合的转染液加入细胞中,摇动培养板混匀,收集细胞检测表达。

1.3 细胞膜、内质网钠通道蛋白分离:常规分离细胞膜蛋白。细胞用 5 mL Buffer (25 mM Tris-HCl pH=7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1× protease inhibitor cocktail) 吹下来;转入 10 mL 离心管中超声破碎,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min;取上清 4 °C 100 000×g 离心 1 h,去上清,沉淀用 200 L 的 Buffer (20 mM Tris-HCl pH=7.4, 137 mM NaCl, 10% V/V glycerol, 1% V/

V Nonidet P-40, 1× protease inhibitor cocktail) 重悬沉淀,4 °C 翻转 30 min;12 000 r/min,4 °C 离心 5 min,取上清即为膜蛋白溶液。

1.4 Western blot 免疫印迹分析:各组细胞加入细胞裂解液提取总蛋白,调整蛋白上样量,使各组上样量相等,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离,然后转移至 PDVF,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,分别用 $\text{Na}_v1.5$ 、 β -actin 和 integrin $\alpha 5$ 的一抗与膜结合,4 °C 孵育过夜。0.1% 吐温的 TBST 缓冲液洗膜 3 遍后,分别与辣根过氧化物酶标记的二抗结合,室温孵育 1 h,采用增强化学发光法。显色终止后在 Labworks 软件下对阳性条带进行吸光度积分(A 值)扫描。

1.5 细胞免疫荧光染色:细胞($\text{Na}_v1.5$ /HEK293 细胞)分别共转染野生型或者突变型 Sar1 基因质粒;细胞根据所需密度铺在细胞爬片上,培养过夜;吸干培养基,用 PBS 洗 3 次;加入 4% 多聚甲醛固定 30 min;吸去多聚甲醛,用 PBS 洗 3 次;加入 PBST (0.1% Triton X-100) 室温浸泡 30 min;用 PBS 室温洗 3 次;10% 山羊血清室温封闭 60 min;吸去多余封闭液,加适量稀释的一抗 100 L 于玻片上覆盖,37 °C 1 h 或者 4 °C 过夜;PBS 洗 5 次,此后避光操作;加适量稀释的二抗 100 L 于玻片,37 °C 30 min;用 PBS 洗 5 次,再加 100 L DAPI 工作液,覆盖玻片室温 30 min;PBS 洗 5 次;于载玻片上滴加 30~60 L 50% 甘油,将爬片轻轻地覆盖在甘油上,用吸水纸吸去多余的甘油,用指甲油封片;利用 confocal 显微镜观察 $\text{Na}_v1.5$ 在细胞内及细胞膜上的分布。

1.6 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR):检测细胞中基因的表达含量使用 Roche 公司的 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂盒,具体实验步骤如下:反应体系 12 L,组分包括 SYBR Green (2×) 6 L, Primer Mix 0.5 L, cDNA 模板 2 L, 灭菌超纯水 3.5 L;反应条件为 95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 共循环 44 次,在退火阶段检测荧光;融解曲线条件为 50 °C 15 s;数据分析通过相对定量 - $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法进行。

1.7 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sar1 蛋白突变后减少了全细胞裂解液和细胞

膜上 $\text{Na}_v1.5$ 的表达: 在稳定表达 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白的 HEK293 细胞中瞬时转染 CMV10-3 × flag、WT-Sar1、39-Sar1 和 H79G-Sar1 质粒, 随后用 Western blot 检测全细胞裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达情况。图 1 结果表明与转染 CMV10-3 × flag 和 WT-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 相比, 转染突变 39-Sar1 和 H79G-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中全细胞裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达显著降低。

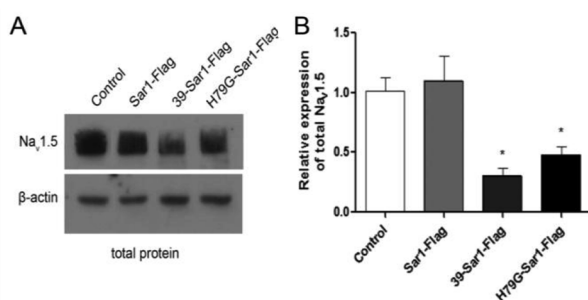


图 1 小 G 蛋白 Sar1 突变 39-Sar1 和 H79G-Sar1 抑制了 $\text{Na}_v1.5$ 的表达 (HEK293 细胞全细胞裂解)

$\text{Na}_v1.5$ 是一种膜蛋白, 分析细胞膜上 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白的表达更具有意义, 因此我们分离细胞膜蛋白并利用 Western blot 检测细胞膜上 $\text{Na}_v1.5$ 的表达。如图 2 所示, 与转染 CMV10-3 × flag 和 WT-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞相比, 转染突变 39-Sar1 和 H79G-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中细胞膜上 $\text{Na}_v1.5$ 的表达显著降低, 与全细胞裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达是一致的。

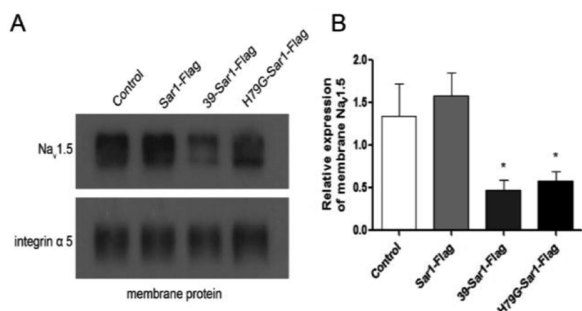


图 2 小 G 蛋白 Sar1 突变 39-Sar1 和 H79G-Sar1 抑制 $\text{Na}_v1.5$ 的转运 (HEK293 细胞细胞膜裂解液)

2.2 Sar1 突变后减少了细胞膜上 $\text{Na}_v1.5$ 的定位: 我们采用免疫荧光技术来研究瞬时转染 CMV10-3 × flag、WT-Sar1、39-Sar1 和 H79G-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中 $\text{Na}_v1.5$ 的分布情况。如图 3 和 4 所示, 转染 WT-Sar1 质粒的 HEK293/

$\text{Na}_v1.5$ 细胞中细胞边缘的 $\text{Na}_v1.5$ 表达很强, 而转染 39-Sar1 和 H79G-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中细胞边缘的 $\text{Na}_v1.5$ 表达很弱。

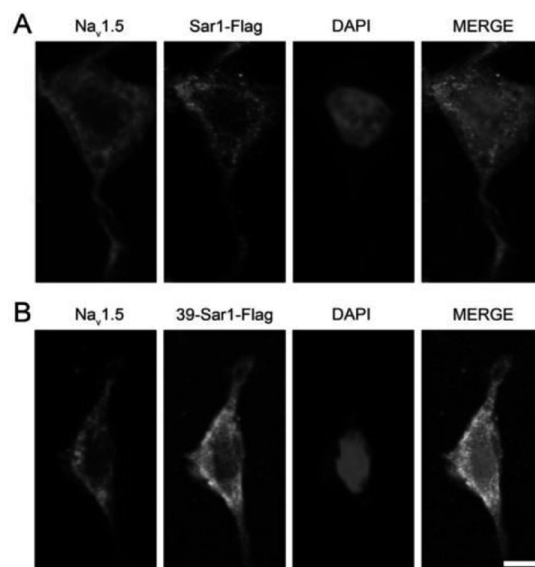


图 3 39-Sar1 改变了 $\text{Na}_v1.5$ 在细胞内的定位

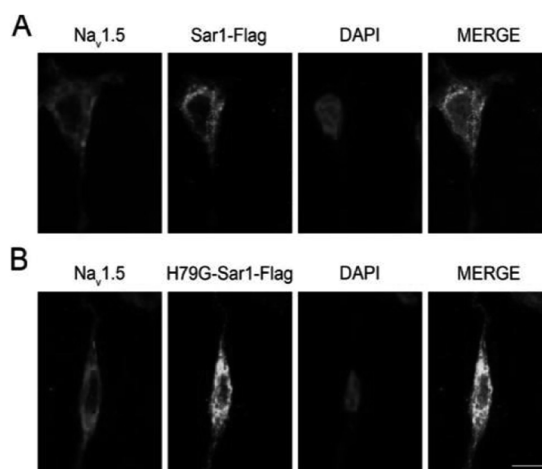


图 4 H79G-Sar1 改变了 $\text{Na}_v1.5$ 在细胞内的定位

2.3 Sar1 并不影响 $\text{Na}_v1.5$ mRNA 的表达: 随后我们利用 RT-PCR 技术在 mRNA 水平上研究 Sar1 对钠通道蛋白的表达, 结果表明, 转染 Sar1-WT 后 SCN5A 表达稍微降低, 但并没有显著差异, 同样转染 Sar1-39 后 SCN5A 表达也稍微降低, 与转染 Sar1-WT 后也并不存在显著差异 (图 5)。

2.4 $\text{Na}_v1.5$ 的表达不受 ARF1 突变的影响: 在稳定表达 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白的 HEK293 细胞中瞬时转染 HA-CMV10、WT-ARF1 和 Q71-ARF1 质粒, 随后用 Western blot 检测全细胞裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达情况。图 6 结果表明与转染 HA-CMV10 和

WT-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 相比, 转染突变 Q79-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞全裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达并没有显著变化。

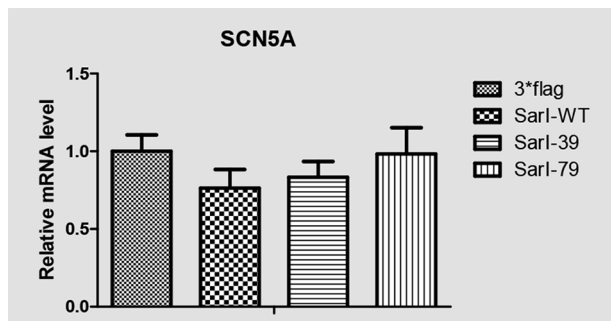


图 5 Sarl 突变不影响 $\text{Na}_v1.5$ mRNA 表达

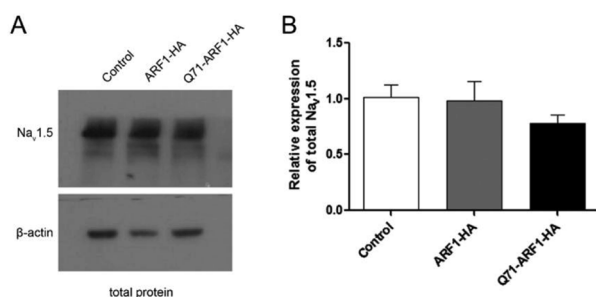


图 6 ARF1 并不影响 $\text{Na}_v1.5$ 的表达 (HEK293 细胞全细胞裂解液)

同样, 我们分离细胞膜蛋白并利用 Western blot 检测细胞膜上 $\text{Na}_v1.5$ 的表达。如图 7 所示, 与转染 HA-CMV10 和 WT-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞相比, 转染突变 Q71-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中细胞膜上 $\text{Na}_v1.5$ 的表达并没有显著变化, 与全细胞裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达是一致的。

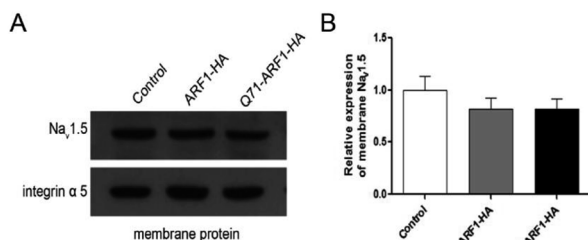


图 7 ARF1 并不影响 $\text{Na}_v1.5$ 的表达 (HEK293 细胞膜裂解液)

2.5 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白的分布受 ARF1 突变的影响不显著: 接着我们用免疫荧光技术检测 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白在

细胞中的分布情况。如图 8 所示, 转染 WT-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中的 $\text{Na}_v1.5$ 表达比较强 (红色), 而转染突变质粒 Q79-ARF1 表达比较弱 (红色), 而且转染 WT-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白和 ARF1-HA 蛋白共表达 (黄色) 要比转染 Q79L-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞强。

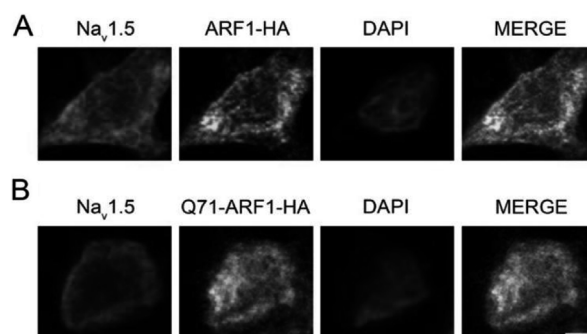


图 8 ARF1 不会显著影响细胞内 $\text{Na}_v1.5$ 的分布

3 讨论

SCN5A 基因编码心肌细胞钠通道 α 亚基 ($\text{Na}_v1.5$), 在心肌快速去极化和冲动传导过程中起关键作用, 其表达改变容易导致严重的心律失常甚至猝死。在真核细胞中, 物质从内质网转运到高尔基体是由一系列囊泡所介导的。Sarl-GTP 在具有 GAP 活性的 Sec23 作用下发生水解, 进而使囊泡从内质网中脱离出来。SarlGTPase 作为一个分子开关控制蛋白质与蛋白质, 以及蛋白质与脂质之间的相互作用, 并调控它们从内质网中分泌出来^[7-8]。ARF1 是 Arf 家族中数量最多、分布最广的蛋白, 在各种细胞中与高尔基体相互作用, 发挥着物质运输的功能。ARF1 在 COPI 囊泡的形成中起着重要作用。

未成熟的 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白在内质网上合成, 随后在高尔基体上进行转录后修饰和糖基化, 这能增加成熟 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白的分子量。成熟的 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白主要表达在细胞膜上。因此, 本研究中我们检测 $\text{Na}_v1.5$ 蛋白在全细胞裂解液和细胞膜上的表达。本研究发现与转染 CMV10-3 \times flag 和 WT-Sarl 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 相比, 转染突变 39-Sarl 和 H79G-Sarl 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中全细胞裂解液和膜裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达显著降低, 这些结果表明小 G 蛋白可能在调节 $\text{Na}_v1.5$ 的表达中起着重要作用。我们的结果提示转染 WT-Sarl 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中细胞边缘的 $\text{Na}_v1.5$

表达很强,而转染 39-Sar1 和 H79G-Sar1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞中细胞边缘的 $\text{Na}_v1.5$ 表达很弱,这些结果进一步说明小 G 蛋白 Sar1 的突变能抑制 $\text{Na}_v1.5$ 的转运。同时, Sar1 并不影响 $\text{Na}_v1.5$ mRNA 表达,其具体调节机制有待进一步研究。另外,我们发现与转染 HA-CMV10 和 WT-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 相比,转染突变 Q79-ARF1 质粒的 HEK293/ $\text{Na}_v1.5$ 细胞全裂解液和膜裂解液中 $\text{Na}_v1.5$ 的表达并没有显著变化;而且小 G 蛋白 ARF1 的突变对 $\text{Na}_v1.5$ 转运的影响不是那么显著。这些结果提示 ARF1 可能不显著影响 $\text{Na}_v1.5$ 的表达和转运。

Yoo 等^[9]的研究表明 Sar1 的突变能显著影响 CFTR Cl-通道的转运,而 ARF1 的突变并不影响 CFTR Cl-通道的转运。Delisle 等^[10]的研究表明 Sar1 的突变能显著抑制钾离子通道蛋白 hERG 的转运,而 ARF1 并不显著影响 hERG 的转运,但能显著影响 VSVG-GFP 和 Kir2.1 的转运。我们的结果和以上 2 个研究结果相似,提示他们可能具有类似的调控机制。综上,本文探索了小 G 蛋白 Sar1 和 ARF1 对钠通道蛋白转运的调控作用,为研究 SCN5A 基因相关疾病的发病机制和今后以干预囊泡转运过程为靶点设计药物进行此类疾病的靶向治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] Abriel H, Zaklyazminskaya E V. Cardiac channelopathies: Genetic and molecular mechanisms [J]. *Gene*, 2013, 517 (1): 1-11.
- [2] Coronel R, Casini S, Koopmann T T, et al. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome—A combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study [J]. *Circulation*, 2005, 112 (18): 2769-2777.
- [3] Valdivia C R, Tester D J, Rok B A, et al. A trafficking defective, brugada syndrome-causing SCN5A in mutation rescued by drugs [J]. *Cardiovascular Research*, 2004, 62 (1): 53-62.
- [4] London B, Michalec M, Mehdi H, et al. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na^+ current and causes inherited Arrhythmias [J]. *Circulation*, 2007, 116 (20): 2260-2268.
- [5] Nie Z, Hirsch D S, Randazzo P A. Arf and its many interactors [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 (4): 396-404.
- [6] Stenmark H, Olkkonen V M. The Rab GTPase family [J]. *Genome Biol*, 2001, 2 (5): Review, S3007.
- [7] Amor J C, Harrison D H, Kahn R A, et al. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP [J]. *Nature*, 1994, 372 (6507): 704-708.
- [8] Bednarek S Y, Ravazzola M, Hosobuchi M, et al. COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast [J]. *Cell*, 1995, 83 (7): 1183-1196.
- [9] Yoo J S, Moyer B D, Bannykh S, et al. Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (13): 11401-11409.
- [10] Delisle B P, Underkofler H A S, Moungey B M, et al. Small GTPase determinants for the golgi processing and plasmalemmal expression of human ether-a-go-go related (hERG) K^+ channels [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (5): 2844-2853.