

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.012

全面性癫痫伴热性惊厥附加症 SCN1A 基因 G302D 突变的膜片钳电生理研究*

刘超¹ 肖乐¹ 段现来² 王爱民¹ 曾乐平^{3Δ}

(1 长沙市第一医院 湖南 长沙 410005; 2 长沙市第三医院 湖南 长沙 410005; 3 中南大学湘雅医学院 湖南 长沙 410013)

摘要 目的:探讨全面性癫痫伴热性惊厥附加症(GEFS+)SCN1A 基因 G302D 突变的电生理机制。**方法:**采用体外定点诱变法构建携带有基因突变 G302D 的 pCMV-SCN1A 的表达载体, lipo2000 脂质体转染法共转染 pCMV-SCN1A-G302D 质粒和 pCD8-IRES-SCN1B 质粒到 HEK-293 细胞系, 进行全细胞膜片钳电生理实验记录 Nav1.1 通道电流及动力学参数, 由 pClamp10.0 以及 OriginPro8.0 软件分析。**结果:**SCN1A-G302D 突变体与野生型相比, 电流密度降低, 激活速度减慢, 失活后恢复时间延长。失活参数两者相比没有显著性统计学差异。**结论:**SCN1A 基因 G302D 突变导致 Nav1.1 通道功能部分丧失, 可能是导致 GEFS+ 的病因。

关键词:全面性癫痫伴热性惊厥附加症; SCN1A 基因; 突变; 钠离子通道

中图分类号:R-33; R742.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-2461-04

Functional Analysis of a Novel SCN1A Mutation G302D Identified in GEFS+*

LIU Chao¹, XIAO Le¹, DUAN Xian-lai², WANG Ai-min¹, ZENG Le-ping^{3Δ}

(1 The first hospital of changsha, Changsha, Hunan, 410005, China; 2 The third hospital of changsha, Changsha, Hunan, 410005, China;

3 Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China)

ABSTRACT Objective: To elucidate the molecular and electrophysiological mechanisms of generalized epilepsy with febrile seizures plus through functional analysis of a novel SCN1A gene mutation G302D. **Methods:** A recombinant plasmid pCMV-SCN1A containing the mutant G302D was constructed by the PCR-based site-directed mutagenesis technique. Lipofectamine 2000 was used to co-transfect the plasmid pCMV-SCN1A-G302D and pCD8-IRES-SCN1B into HEK-293 cells line to induce stable expression of α 1 and β 1 subunit of Na⁺ channel. During patch clamp detection, the standard stimulus was given in the whole-cell voltage clamp mode. Data acquisition and analysis were accomplished with PatchMaster10.0 and OriginPro8.0. **Results:** SCN1A-G302D mutants displayed a decreased current density, a slower activation and a significantly delayed recovery from inactivation. There were no significantly differences in the steady-state inactivation between two groups. **Conclusions:** These data indicates that SCN1A-G302D mutants result in partial loss of function, which may be the cause of GEFS +.

Key words: Generalized epilepsy with febrile seizures plus; SCN1A gene; Mutations; Sodium ion channel

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)18-2461-04

前言

SCN1A 基因编码电压门控钠离子通道 α 1 亚单位(Nav1.1), 主要表达在 GABA 能中间神经元, 在神经元动作电位的发生和传播中发挥关键作用^[1]。研究发现 SCN1A 基因的突变可导致以下三种癫痫综合征: 全面性癫痫伴热性惊厥附加症(generalized epilepsy with febrile seizures plus, GEFS+)^[2], 婴儿重症肌阵挛癫痫(severe myoclonic epilepsy of infancy, SMEI)^[3]和部分性癫痫伴热性惊厥附加症(partial epilepsy with febrile seizures plus, PEFS+)^[4]。目前, 文献报道的关于 SCN1A 基因错

义突变约 400 个, 其中约 60 个突变位点进行了电生理功能研究, SCN1A 基因突变的电生理功能研究相对较少^[5]。在前期的研究中, 我们在 GEFS+ 患者基因筛查发现了 SCN1A 基因一个新生突变 c.905G>A, 该突变导致钠通道蛋白第 302 位甘氨酸(G)突变为天冬氨酸(D)。通过 Varcards 生物预测软件显示该突变具有致病性^[6], 为进一步明确该突变导致 Nav1.1 钠通道电生理功能障碍并致病, 让携带突变的 SCN1A 基因质粒在体外异质系统中表达, 然后应用膜片钳电生理技术进行检测, 分析正常的 Nav1.1 钠通道与突变的 Nav1.1 钠通道的电生理学的差异。

* 基金项目: 湖南省科技计划项目(2016JC2054); 长沙市科技计划项目(kq1706001)

作者简介: 刘超(1981-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 离子通道疾病

Δ 通讯作者: 曾乐平(1978-), 男, 医学博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事神经损伤与修复研究, E-mail: zenglp0205@163.com

(收稿日期: 2019-06-23 接受日期: 2019-07-18)

1 材料和方法

1.1 质粒来源与构建

美国 Alfred L. George 教授惠赠含有 SCN1A 基因的真核细胞表达质粒(pCMV-SCN1A)^[7]。定点诱变使用 Quick Change 系列突变试剂盒, DNA 测序明确定点诱变成功与否。

1.2 细胞培养与质粒转染

HEK-293 细胞接种到 6 孔板上, 培养液为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 采用 Lipofectamine 2000 试剂盒进行转染, 转染 48h 后开始膜片钳实验。

1.3 电生理检测方法

细胞外液成分 (mmol/L): NaCl 140, MgCl₂ 1, KCl 3, CaCl₂ 1, HEPES 10, Glucose 5.0 (pH 值 7.4, 1M 的 NaOH 调制)。细胞内液成分 (mmol/L): CsF 140, NaCl 10, EGTA 1, HEPES 10 (pH 值 7.4, 1M 的 CsOH 调制)。采用全细胞记录电压钳模式, 低通滤波 2KHz, 采样频率 10KHz。串联电阻约 $5 \pm 2 M\Omega$, 给予 70% 和 90% 的电阻和电容补偿。实验数据由 Axon 200B 放大器进行采集。

1.4 钠通道电生理动力学方案

钠通道的电压依赖性激活: 钠通道的电压依赖性激活电压

刺激设置方案见拟合图, 采用 Boltzman 方程对激活曲线进行拟合, 确定通道激活 50% 时的脉冲电压 ($V_{1/2}$), 斜率因子 (k)。

钠通道的电压依赖性快失活: 钠通道的电压依赖性快失活电压刺激设置方案见拟合图, 采用 Boltzmann 方程失活曲线进行拟合, 确定通道失活 50% 时的脉冲电压 ($V_{1/2}$), 斜率因子 (k)。

钠通道的快速失活后恢复: 钠通道的快速失活后恢复电压刺激设置方案见拟合图, 采用双指数方程对失活后恢复曲线进行拟合, 确定恢复时间常数 τ_{fast} 和 τ_{slow} 。

1.5 统计分析

计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 细胞电生理学结果使用 OriginPro 8.0 软件包进行作图, 使用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析, 两样本均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒突变结果

测序证实: 甘氨酸密码子 (GGT) 突变为天冬氨酸密码子 (GAT) (图 1), SCN1A 基因未出现其他意外突变。

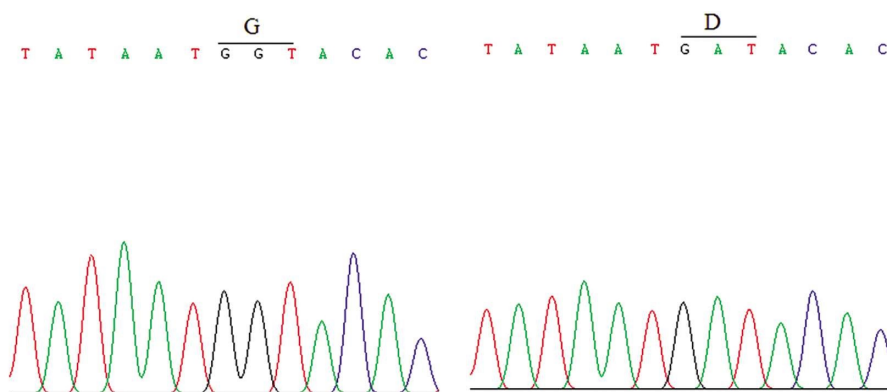


图 1 pCMV-SCN1A-G302D 质粒突变位点的序列测定

Fig. 1 DNA sequence for mutant site of pCMV-SCN1A-G302D plasmid

2.2 膜片钳电生理电流密度比较

Nav1.1 野生型和 G302D 突变体的钠电流图 (图 2), 电流密度曲线见图 3, Nav1.1 野生型和 G302D 突变体电流密度在去极化至 -10 mV 达最大值, 分别为 -232.1 ± 20.4 (pA/pF)

($n=10$) 和 130.7 ± 18.5 (pA/pF) ($n=10$), Nav1.1 野生型电流密度大于 G302D 突变体电流密度 ($P < 0.05$)。

2.3 膜片钳电生理稳态激活动力学比较

激活曲线如图 4 所示, Nav1.1 野生型和 G302D 突变体半

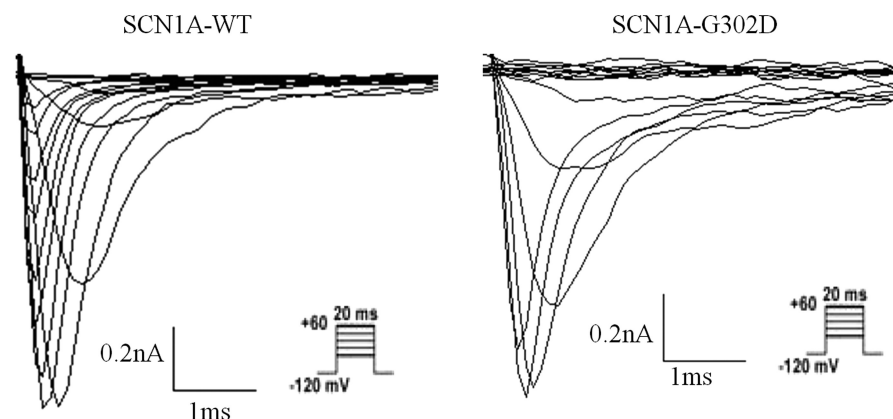


图 2 细胞钠电流记录图

Fig. 2 Whole-cell currents for wild-type and mutant channel

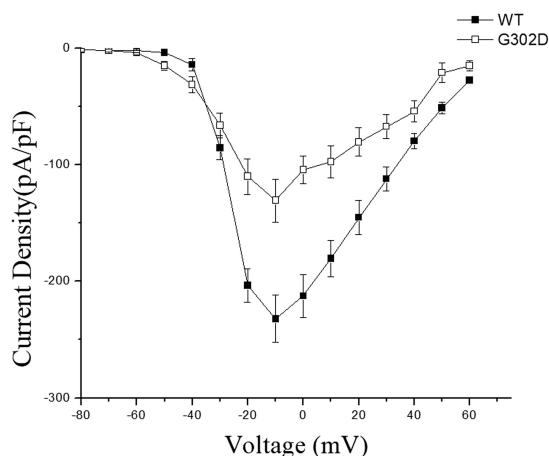


图3 Nav1.1 野生型和 G302D 突变体的电流密度

Fig. 3 Current density for wild-type and mutant channel

数激活电位 ($V_{1/2}$) 分别是 -24.9 ± 1.2 mV ($n=10$) 和 -14.2 ± 1.3 mV ($n=10$), 两组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。Nav1.1 野生型和 G302D 突变体拟合曲线斜率因子 K 分别是 5.0 ± 0.2 和 7.5 ± 0.2 , 两组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

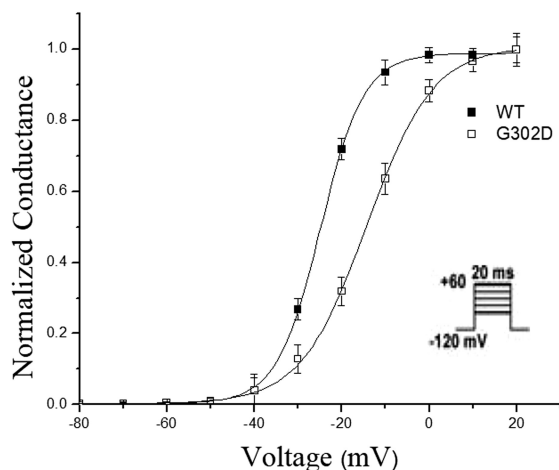


图4 Nav1.1 野生型和 G302D 突变体的激活曲线

Fig. 4 Voltage dependence of channel activation for wild-type and mutant channel

2.4 膜片钳电生理稳态失活动力学比较

稳态失活曲线如图5所示, Nav1.1 野生型和 G302D 突变体半数失活电位 ($V_{1/2}$) 分别是 -52.7 ± 1.3 mV ($n=10$) 和 -54.1 ± 1.4 mV ($n=10$), 两组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。Nav1.1 野生型和 G302D 突变体拟合曲线斜率因子 K 分别是 -8.0 ± 0.2 和 -8.1 ± 0.3 , 两组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 失活后恢复动力学比较

失活后恢复曲线如图6所示, Nav1.1 野生型和 G302D 突变体失活后恢复时间常数 τ_{fast} 分别为 2.1 ± 0.3 ms 和 5.9 ± 0.6 ms ($n=9$), τ_{slow} 分别为 34.1 ± 8.9 ms 和 64.2 ± 11.3 ms, 两组 τ_{fast} 和 τ_{slow} 比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

SCN1A 基因编码 I 型电压门控钠离子通道 α 亚基 (Nav1.1), Nav1.1 由四个高度同源性的结构域 (DI ~ DIV) 通过胞内

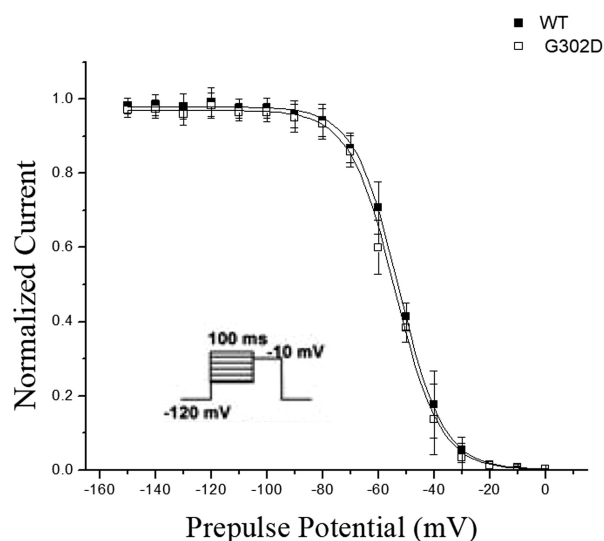


图5 Nav1.1 野生型和 G302D 突变体的稳态失活曲线

Fig. 5 Voltage dependence of fast inactivation for wild-type and mutant channel

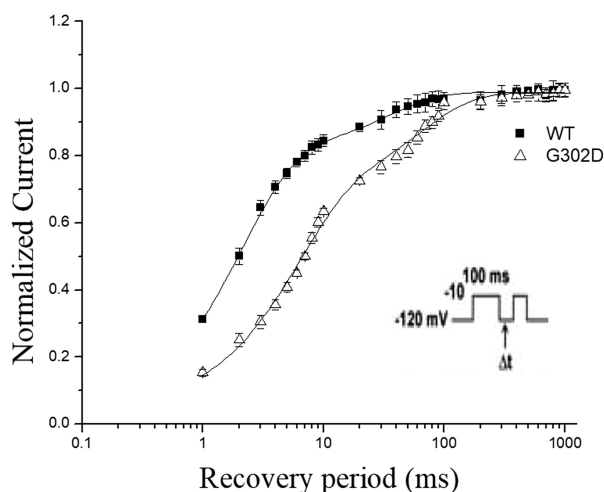


图6 Nav1.1 野生型和 G302D 突变体的失活后恢复曲线

Fig. 6 Time-dependent recovery from fast inactivation for wild-type and mutant channel

连接环相连而成, 每个结构域含有 6 个 α 螺旋跨膜区 (S1 ~ S6)。S5 和 S6 之间的结构形成反向平行的 β 折叠衬于孔道内壁, 称为 P 区 (pore-forming segment), 决定着通道对离子的选择性^[8]。近年来研究显示 SCN1A 基因突变与癫痫密切相关, SCN1A 基因突变导致 Nav1.1 通道功能障碍从而导致癫痫^[9-11]。前期我们从 GEFS+ 患者基因筛查中发现 SCN1A 基因 1 个新生突变 c.905G>A, 该突变导致钠通道蛋白第 302 位甘氨酸 (G) 突变为天冬氨酸 (D)。膜片钳电生理实验显示, G302D 突变体的电流密度降低, 激活速度减慢, 失活后恢复时间延长, 表现为功能部分丧失 "partial loss of function"。SANIA 基因突变的转基因鼠模型研究显示^[12,13], SCN1A 基因突变导致 Nav1.1 通道功能受损, GABA 能中间神经元动作电位发放受到抑制, 从而导致神经网络超兴奋产生痫性放电。将携带 SCN1A 基因突变的 SMEI 患者体细胞诱导为多功能干细胞, 再分化为兴奋性和抑制性神经元, 兴奋性神经元电生理功能未受影响, 抑制性神

经元表现出钠电流和动作电位的缺陷,并提出 Nav1.1 功能受损损害了抑制性神经元功能,从而减少突触后 GABA 受体激活,导致皮质锥体神经元去抑制产生痫性放电^[14,15]。本结果表明,SCN1A 新生突变 G302D 导致 Nav1.1 通道功能减弱,可能是该患者发病的病因。

G302D 突变位于 Nav1.1 通道第 I 跨膜结构域 P 区,还有 2 个位于此区的错义突变进行了电生理研究。采用人工诱导突变的办法^[16],N301S 突变体膜片钳电生理结果显示 Nav1.1 通道功能完全丧失 "complete loss of function"。在 SMEI 患者发现 SCN1A 基因 R393H 突变^[17],该突变也导致 Nav1.1 通道功能完全丧失 "complete loss of function"。G1749E 突变位于 Nav1.1 通道第 IV 跨膜结构域 P 区,该突变导致 Nav1.1 通道功能部分丧失 "partial loss of function"^[18]。本研究结果 G302D 突变体对 Nav1.1 通道功能的影响与之前文献报道具有对比性,也进一步显示 SCN1A 基因突变对 Nav1.1 通道功能的影响的多样性。

研究显示 SCN1A 基因突变对 Nav1.1 通道功能影响程度导致临床表型严重程度不同,完全的 Nav1.1 通道功能丧失常见于严重的临床表型如 SMEI,部分的 Nav1.1 通道功能丧失多见于轻的临床表型如 GEFS+^[5]。在 SCN1A 基因相同位置的不同突变 A1685V 和 A1685D,对 Nav1.1 通道功能影响表现为部分功能丧失和完全功能丧失,从而产生严重程度不同的临床表型 GEFS+ 和 SMEI^[19]。采用诱导多功能干细胞研究进一步证实^[20],SCN1A 基因改变对神经元的电生理损伤有不同的影响,其损伤程度与作为诱导多功能干细胞供体的临床症状严重程度相对应。本研究显示,G302D 突变对 Nav1.1 通道功能影响与临床表型严重程度一致。

参考文献(References)

- [1] Nishino A, Okamura Y. Evolutionary History of Voltage-Gated Sodium Channels[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2018, 246: 3-32
- [2] Claes L, Del Favero J, Ceulemans B, et al. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6): 1327-1332
- [3] Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2 [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 343-345
- [4] Liao WP, Shi YW, Long YS, et al. Partial epilepsy with antecedent febrile seizures and seizure aggravation by antiepileptic drugs: Associated with loss of function of Nav1.1[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(9): 1669-1678
- [5] Meng H, Xu HQ, Yu L, et al. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype[J]. *Hum Mutat*, 2015, 36: 573-80
- [6] Li J, Shi L, Zhang K, et al. VarCards: an integrated genetic and clinical database for coding variants in the human genome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (D1): D1039-D1048
- [7] George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 1990-1999
- [8] Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(Pt 5): 575-84
- [9] Scheffer IE, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes[J]. *Brain*, 1997, 120(Pt 3): 479-90
- [10] Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, et al. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(4): 859-865
- [11] Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, et al. Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295(1): 17-23
- [12] Hedrich UB, Liautard C, Kirschenbaum D, et al. Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(45): 14874-14889
- [13] Tai C, Abe Y, Westenbroek RE, et al. Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of Dravet syndrome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(30): E3139-48
- [14] Higurashi N, Uchida T, Lossin C, et al. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells [J]. *Mol Brain*, 2013, 6: 19
- [15] Sun Y, Paşca SP, Portmann T, et al. A deleterious Nav1.1 mutation selectively impairs telencephalic inhibitory neurons derived from Dravet Syndrome patients[J]. *Elife*, 2016, 5: e13073
- [16] Ohmori I, Kahlig KM, Rhodes TH, et al. Nonfunctional SCN1A is common in severe myoclonic epilepsy of infancy [J]. *Epilepsia*, 2006, 47(10): 1636-1642
- [17] Meng H, Xu HQ, Yu L, et al. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype [J]. *Hum Mutat*, 2015, 36(6): 573-580
- [18] Rhodes TH, Lossin C, Vanoye CG, et al. Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(30): 11147-11152
- [19] Sugiura Y, Ogiwara I, Hoshi A, et al. Different degrees of loss of function between GEFS+ and SMEI Nav1.1 missense mutants at the same residue induced by rescuable folding defects [J]. *Epilepsia*, 2012, 53(6): e111-4
- [20] Kim HW, Quan Z, Kim YB, et al. Differential effects on sodium current impairments by Distinct SCN1A mutations in GABAergic neurons derived from Dravet syndrome patients [J]. *Brain Dev*, 2018, 40(4): 287-298