

· 论著 ·

钙通道突变致早期复极综合征的电生理机制研究

陈秀 陈甘满 张中和 胡丹 夏豪

(武汉大学人民医院心血管内科 武汉大学心血管病研究所 湖北省心脏重点实验室, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究 *CACNA1C*-P817S 突变对早期复极综合征(ERS)的影响及其电生理机制。**方法** 收集 ERS 先证者外周血, 采用二代测序技术, 对 ERS 先证者筛选常见致心肌早期复极的候选基因。构建 *CACNA1C* 野生型(WT)和突变型质粒, 连同 WT-*CACNB2b* 和 WT-*CACNA2D1* 质粒, 分别共转染入人胚肾 293 细胞。采用全细胞膜片钳技术检测细胞电生理功能, 同时应用共聚焦荧光显微镜检测 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白的转运功能。**结果** 基因测序筛选出致 ERS 的突变基因 *CACNA1C*-P817S, 突变使 *CACNA1C* 氨基酸序列上 817 位点的脯氨酸变为丝氨酸。全细胞膜片钳检测结果显示 P817S 组钙电流(I_{Ca})密度较 WT 组降低约 68.8% [WT($n=15$) vs P817S($n=12$): $(-19.2 \pm 1.5) \text{ pA/pF}$ vs $(-6.0 \pm 1.7) \text{ pA/pF}$, $P < 0.001$]。L 型钙离子通道激活未见明显改变, 但失活过程加速 [$V_{1/2}$, WT($n=15$) vs P817S($n=12$): $(-30.4 \pm 0.75) \text{ mV}$ vs $(-41.6 \pm 0.84) \text{ mV}$, $P < 0.001$]。共聚焦检测结果显示, P817S 突变可使 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白转运功能降低[外周荧光强度绝对值, WT vs P817S: $(19.6 \pm 2.0) \text{ MD}$ vs $(12.2 \pm 1.9) \text{ MD}$, $P < 0.01$, $n=4$; 外周/整体荧光强度百分比, WT vs P817S: $(30.2 \pm 2.3) \%$ vs $(20.9 \pm 2.2) \%$, $P < 0.01$, $n=4$]。**结论** *CACNA1C*-P817S 突变通过降低 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白的转运功能和改变通道动力学, 使 I_{Ca} 发生功能性缺失, 提示 *CACNA1C*-P817S 突变是 ERS 的一个明确的致病基因突变。

【关键词】 早期复极综合征; *CACNA1C*; 基因突变; 蛋白转运**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.05.018

Electrophysiological Mechanism of Early Repolarization Syndrome Caused by Calcium Channel Mutation

CHEN Xiu, CHEN Ganxiao, ZHANG Zhonghe, HU Dan, XIA Hao

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute of Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To study the effect of *CACNA1C*-P817S mutation on early repolarization syndrome (ERS) and explore the underlying electrophysiological mechanism. **Methods** After collecting the peripheral blood of the proband, we sequenced several candidate genes encoding ion channels with next generation sequencing which can contribute to ERS, as reported previously. Wild-type (WT) and mutant plasmids of *CACNA1C*, together with the WT plasmids of *CACNB2b*, *CACNA2D1* were co-transfected into human embryonic kidney 293 cells respectively. The studies of electrophysiological function were performed by whole patch-clamp, and membrane trafficking of $\text{Ca}_v1.2$ protein was analyzed through confocal fluorescence microscope. **Results** Gene sequencing identified the mutation of *CACNA1C*-P817S, at the position 817 of the amino acid sequence leading to amino acid change from proline to serine. The results of whole-cell patch-clamp presented that the density of I_{Ca} was reduced approximately by 68.8%, compared to WT [WT($n=15$) vs P817S($n=12$): $(-19.2 \pm 1.5) \text{ pA/pF}$ vs $(-6.0 \pm 1.7) \text{ pA/pF}$, $P < 0.001$]. No significant changes have been seen in steady-state activation, but the steady-state inactivation was accelerated, compared to WT [$V_{1/2}$, WT($n=15$) vs P817S($n=12$): $(-30.4 \pm 0.75) \text{ mV}$ vs $(-41.6 \pm 0.84) \text{ mV}$, $P < 0.001$]. The results of confocal fluorescence microscope revealed that $\text{Ca}_v1.2$ protein membrane trafficking of P817S was decreased [absolute peripheral immunofluorescence intensity, WT vs P817S: $(19.6 \pm 2.0) \text{ MD}$ vs $(12.2 \pm 1.9) \text{ MD}$, $P < 0.01$, $n=4$; ratio of peripheral/whole immunofluorescence intensity, WT vs P817S: $(30.2 \pm 2.3) \%$ vs $(20.9 \pm 2.2) \%$, $P < 0.01$, $n=4$]. **Conclusion** The *CACNA1C*-P817S mutation can defect membrane trafficking and change the channel dynamics of $\text{Ca}_v1.2$ protein, thus inducing a loss-of-function of I_{Ca} , suggesting that *CACNA1C*-P817S is a gene mutation associated to ERS.

【Key words】 Early repolarization syndrome; *CACNA1C*; Gene mutation; Protein trafficking

基金项目: 国家自然科学基金(81670304)

通信作者: 胡丹, E-mail: hudan0716@hotmail.com; 夏豪, E-mail: xiahao1966@163.com

早期复极模式 (early repolarization pattern, ERP) 是指除外 $V_1 \sim V_3$ 导联, 12 导联心电图上 ≥ 2 个相邻导联出现 J 波 (QRS 波群终末切迹或顿挫) 顶点 (J_p) 振幅 ≥ 0.1 mV, QRS 波群时限 (在无切迹或顿挫的导联上) < 120 ms, 伴或不伴 ST 段抬高。过去几十年一直被认为是一种良性心电图改变^[1-2]。直到 2000 年, Gussak 等^[3]通过建立犬心室的楔形组织模型提出, 这种“良性表现”有发展为多形性室性心动过速 (室速) 甚至心室颤动 (室颤) 的倾向。8 年后, Haïssaguerre 等通过多个临床研究证实了这一假说^[4-6]。随后大量流行病学调查研究也发现, ERP (尤其是位于下/侧壁) 会增加恶性心律失常事件和心源性猝死的风险^[7-8]。心电图下壁和/或侧壁导联记录到 ERP, 并伴有心搏骤停幸存史或室速/室颤史的患者即可被诊断为早期复极综合征 (early repolarization syndrome, ERS)。ERS 具有明显的家族遗传倾向, 目前已发现的与 ERS 有关的离子通道异常基因有: *KCNJ8*、*CACNA1C*、*CACNB2b*、*CACNA2D1*、*ABCC9*、*SCN5A*、*SCN10A* 和 *KCND3*^[9-15]。但目前仅对一小部分已识别的突变进行了功能表达的研究, 确定了这些突变与 ERS 的因果关系及较为合理的致病机制。本研究利用二代测序技术、全细胞膜片钳、共聚焦荧光显微镜等实验技术, 探究 *CACNA1C*-P817S 突变与 ERS 的因果关系及其可能的致病机制。

1 材料和方法

1.1 病例收集与遗传学分析

本研究遵循赫尔辛基宣言和本单位伦理学规章制度, 患者签署知情同意书。收集就诊于武汉大学人民医院心血管内科的 ERS 患者, 入选标准: 心电图下壁和/或侧壁导联记录到 ERP, 并伴有心搏骤停幸存史或室速/室颤史者; ERP: 除外 $V_1 \sim V_3$ 导联, 12 导联心电图上 ≥ 2 个相邻导联出现 J 波 (QRS 波群终末切迹或顿挫) 顶点 (J_p) 振幅 ≥ 0.1 mV, QRS 波群时限 (在无切迹或顿挫的导联上) < 120 ms, 伴或不伴 ST 段抬高^[1-2]。排除标准: 所有患者需排除 ST 段抬高心肌梗死、心室动脉瘤、心包疾病、电解质紊乱 (高钾和低钙等)、体温过低、致心律失常型右室心肌病等其他原因导致的 ST 段异常抬高。临床评估包括: 病史、详细的体格检查、血液检查、心电图、超声心动图和冠状动脉造影。收集其外周血样本, 从外周血白细胞中提取 DNA, 采用二代测序技术, 对常见致心肌早期复极的候选基因 (*KCNJ8*、*CACNA1C*、*CACNB2b*、*CACNA2D1*、*ABCC9*、*SCN5A*、*SCN10A* 和 *KCND3*) 进行测序。这些候选基因的确定是基于既往报道的致 ERS 的突变基

因。PCR 扩增候选基因的外显子及外显子与内含子的接头序列, 将纯化的 PCR 产物于 ABI 3730 遗传分析仪 (Applied Biosystem, 美国) 上进行循环测序, 测序结果由 Mutation Surveyor V4.0.8 软件 (Softgenetics, 美国) 进行分析, 并重复以上程序再次确认。被认为具有致病性的新突变为: (1) 终止/移码突变; (2) 错义突变位于物种间氨基酸保守区域; (3) 符合 GT-AT 法则的剪切位点突变; (4) 对照人群中最小等位基因频率 (MAF) < 0.005 ; 和/或 (5) 通过 PolyPhen-2 和 MetaLR 软件预测可能有害或致病的突变。

1.2 HEK 细胞的转染

将野生型 (WT) 和携带突变的 *CACNA1C* 全长 cDNA 序列克隆于带有增强型黄色荧光蛋白 (EYFP) 的 pcDNA3.1 载体, 构建相应质粒。同时将 WT-*CACNB2b* 和 *CACNA2D1* 全长 cDNA 序列克隆于 pcDNA3.1 载体, 构建 WT-*CACNB2b* 和 WT-*CACNA2D1* 质粒。将 3 种质粒按 1 : 1 : 1 的比例, 按照 Lipofectamine 2000 说明书用 Lipofectamine 2000 转染试剂 (Life Technologies, 美国) 共转染入人胚肾 293 (HEK293) 细胞 (中科院上海细胞库, 中国)。

1.3 细胞电生理检测

选取转染后 48 ~ 72 h, 在倒置荧光显微镜 (IX70, Olympus, 日本) 下观察, 为单个独立、表面光滑、形态良好且贴壁牢固的带有黄色荧光的细胞, 置于配置好的细胞外液中 ($MgCl_2$ 1 mmol/L、 $CaCl_2$ 2 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L、TEA 150 mmol/L、CsOH 调节 pH 至 7.35)。全细胞膜片钳系统使用 AXON-700B 膜片钳放大器 (Axon Instruments, 美国) 来记录 I_{Ca} , 全过程在室温 (20 ~ 23 °C) 下进行。连接膜片钳放大器与计算机, 由 pCLAMP 10.4 软件 (Axon Instruments, 美国) 控制, Digidata 1440A 数模转换器 (Axon Instruments, 美国) 采集信号。玻璃微电极充灌电极内液后 ($CsCl$ 110 mmol/L、 $CaCl_2$ 0.1 mmol/L、EGTA 10 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、Mg-ATP 2 mmol/L、TEA 10 mmol/L、CsOH 调节 pH 至 7.35), 对选取的细胞进行负压封接和破膜, 形成全细胞记录模式, 记录 I_{Ca} 。补充细胞膜电容, 串联电阻自动进行补偿 70% ~ 80%。保持电位为 -90 mV, 命令电位依次为 -60 ~ +60 mV, 测试脉冲 400 ms, 步阶 10 mV, 在以脉冲电压为横轴, 电流密度 (电流值/细胞膜电容) 为纵轴, 绘制电流-电压 (I-V) 曲线。保持电位为 -90 mV, 命令电位依次为 -60 ~ +60 mV, 测试脉冲 400 ms, 步阶 10 mV, 以脉冲电压为横轴, G/G_{max} 为纵轴 [$G = I_p / (V_m - V_R)$], 绘制电压依赖的稳态激活 (steady-state activation, SSA) 曲线, 采用 Boltzmann 方程对 SSA 曲线

进行拟合: $G/G_{\max} = 1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/k]$ 。保持电位为 -90 mV, 命令电位依次为 $-100 \sim +20$ mV, 测试脉冲 400 ms, 步阶 10 mV, 以脉冲电压为横轴, I/I_{\max} 为纵轴, 绘制电压依赖的稳态失活 (steady-state inactivation, SSI) 曲线, 采用 Boltzmann 方程对 SSI 曲线进行拟合: $I/I_{\max} = 1 + \exp[(V_m - V_{1/2})/k]$ 。G 为全细胞通道激活电导, G_{\max} 为全细胞通道最大激活电导, I_{tp} 为不同电压下全细胞峰值电流, V_R 为通道的反转电位, I_{\max} 为电流最大值, V_m 为去极化脉冲电压, $V_{1/2}$ 为半激活/半失活电压, k 为斜率因子。

1.4 共聚焦荧光显微镜检测

选取转染后 48 h 的带有 pEYFP 黄色荧光的 HEK293 细胞, 放在共聚焦荧光显微镜 (TCS SP8, Leica Microsystems, 德国) 下采集荧光图像。在 XYZ 三维层面上检测分析 EYFP 标记的细胞, 限定细胞膜 $2 \mu\text{m}$ 区域为外周染色, 分别测量外周和细胞整体平均荧光强度, 并计算外周与整体平均荧光强度的比值, 测量结果直接用测量得到的平均荧光强度进行比较, 未标准化为细胞面积后的值进行比较。图片使用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析平均荧光强度。

1.5 统计学方法

膜片钳数据采用 Origin 9.0 软件进行数据分析和绘图。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析

先证者是 1 例 20 岁男性青年, 两次运动过程中发生晕厥史。常规心电图提示 (如图 1): 窦性心动过缓 ($\text{HR} = 46$ 次/min), $\text{QRS} = 98$ ms, $\text{QTc} = 367$ ms, II、III、aVF、 $V_2 \sim V_6$ 导联 J 波抬高均 ≥ 0.1 mV, 其中 II、III 和 aVF 导联抬高 ≥ 0.2 mV, $V_2 \sim V_5$ 导联可见 ST 段呈上斜型抬高, 排除了引起 ST 段异常抬高的其他可能原因, 包括急性心肌梗死和心室动脉瘤等。体格检查未发现异常; 超声检查提示右房和右室轻度扩大, 左室和右室射血分数均正常; 既往无心搏骤停史, 否认 ERS 和心源性猝死家族史。

2.2 遗传学分析

该 ERS 先证者致病基因为编码 L 型钙离子通道 (LTCC) 的 α_1 亚单位 *CACNA1C*, 为错义突变, 且位于氨基酸保守区域。突变位于 17 号外显子上核苷酸 2449 区, 胞嘧啶 C 突变成胸腺嘧啶 T (c. 2449 C>T), 使脯氨酸 (P) 被丝氨酸 (S) 所替代 (P817S), $\text{Ca}_v1.2$ 的 D II/III 结构域。MAF 为 0.002, PolyPhen-2 (评分为

0.997)、MetaLR 软件 (评分为 0.839) 预测可能为有害突变。

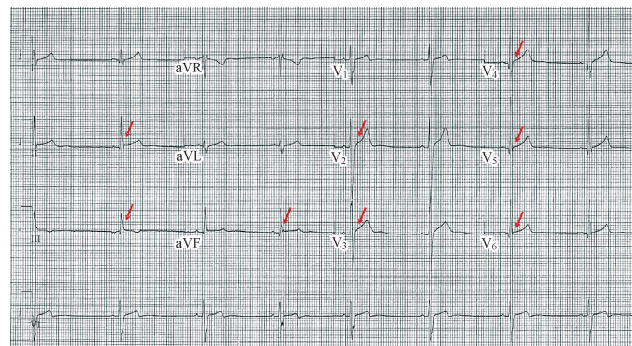


图 1 ERS 先证者常规心电图 (25 mm/s, 10 mm/mV)

2.3 细胞电生理检测

2.3.1 *CACNA1C*-P817S 突变对 I_{Ca} 曲线的影响

如图 2, P817S 组 I_{Ca} 密度较 WT 组显著降低, 在 0 mV 时峰电流密度降低了约 68.8%, 从 (-19.2 ± 1.5) pA/pF 降至 (-6.0 ± 1.7) pA/pF。

2.3.2 *CACNA1C*-P817S 突变对 I_{Ca} SSA 曲线的影响

如图 3A-C, 两组 SSA 曲线无明显差异, 半激活电压 $V_{1/2}$ 分别为 WT 组 (11.3 ± 1.5) mV 和 P817S 组 (12.5 ± 1.5) mV, SSA 曲线斜率 k 也无明显改变 (WT vs P817S: 6.3 ± 1.0 vs 6.5 ± 1.3 , $P > 0.05$)。

2.3.3 *CACNA1C*-P817S 突变对 I_{Ca} SSI 曲线的影响

如图 3D-F, P817S 突变使半失活电压 $V_{1/2}$ 明显减小, $V_{1/2}$ 由 (-30.4 ± 0.75) mV 变为 (-41.6 ± 0.84) mV, 但失活曲线斜率 k 保持不变 (WT vs P817S: 7.4 ± 1.1 vs 6.5 ± 1.3 , $P > 0.05$)。提示 *CACNA1C*-P817S 突变加速了 LTCC 的稳态失活。

2.4 转运功能研究

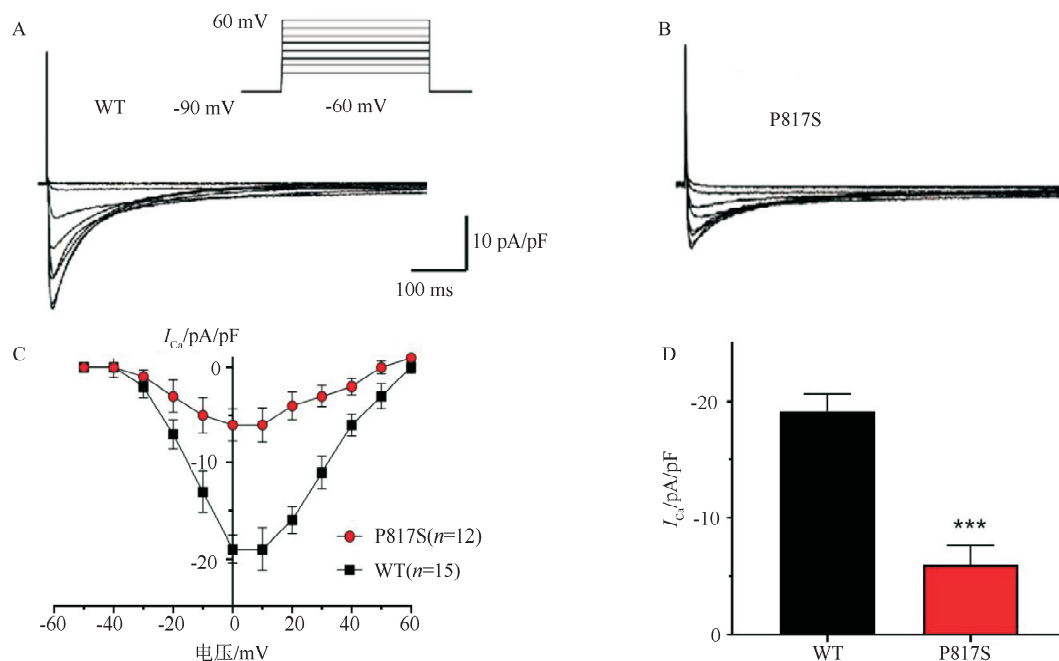
与 WT 组相比, P817S 组 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白外周荧光强度的绝对值明显降低 [WT vs P817S: (19.6 ± 2.0) MD vs (12.2 ± 1.9) MD, $P < 0.01$], 如图 3C。P817S 组 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白外周/整体荧光强度的百分比也较 WT 组降低 (WT vs P817S: $(30.2 \pm 2.3)\%$ vs $(20.9 \pm 2.2)\%$, $P < 0.01$, $n = 4$), 如图 3D, 提示 P817S 突变组细胞 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白转运功能降低。

3 讨论

离子通道疾病是年龄 < 30 岁人群中心源性猝死的主要原因, 而基因和分子是这类疾病的决定性因素^[16-17]。ERS 作为离子通道疾病的一种, 如前所述, 其心电图表现即 ERP 一直被认为是一种良性表现, 一直到 2008 年, Haïssaguerre 等^[4] 的开创性研究发现 ERS 与恶性心律失常及心源性猝死相关。2013 年, ERS 在《2013 HRS/EHRA/APHRs 遗传性心律失常综合征诊治专家共识》中首次作为一种独立的遗传心律

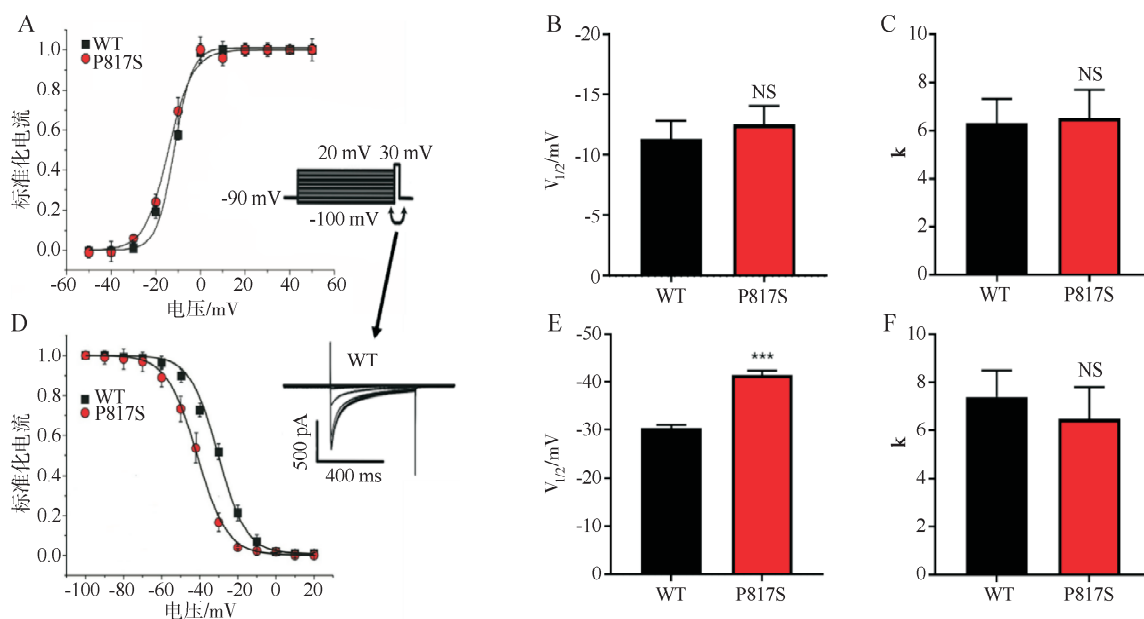
失常被提出^[18]。目前发现与 ERS 相关的离子通道有 3 种(I_{K-ATP} 、 I_{Ca-L} 和 I_{Na}), 相关的基因突变有 *KCNJ8*、*CACNA1C*、*CACNB2b*、*CACNA2D1*、*ABCC9*、*SCN5A*、*SCN10A* 和 *KCND3*。但目前仅对一小部分已识别的突变进行了功能表达的研究, 确定了这些突变与 ERS 的

因果关系以及较为合理的致病机制。因此, 对基因突变的功能性和生物验证是基因检测结果解读的环节。本研究通过对 *CACNA1C*-P817S 突变进行了相应的功能性和生物研究, 探究 *CACNA1C*-P817S 突变与 ERS 的因果关系及其可能的致病机制。



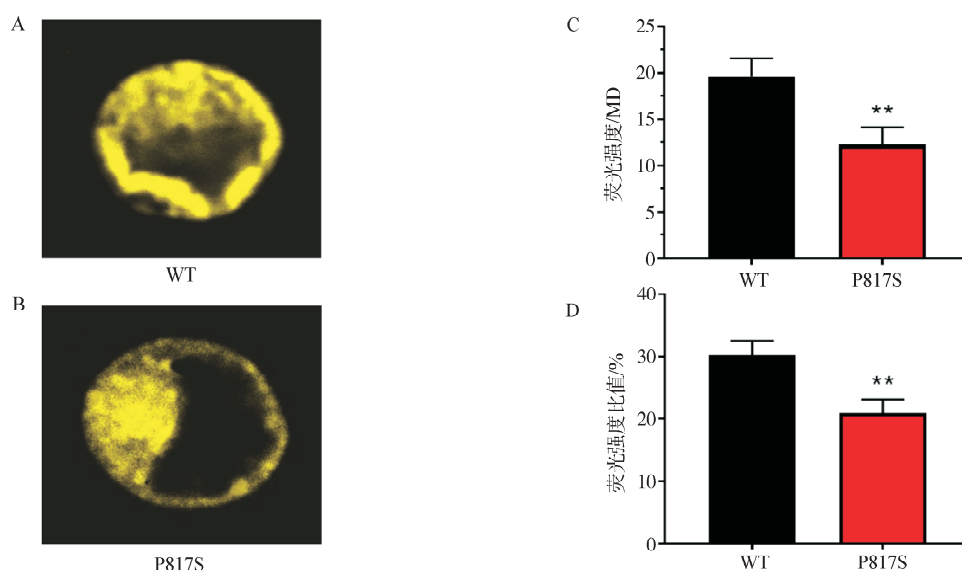
注: A 和 B 为两组细胞 I_{Ca} 原始电流曲线记录图; C 为两组细胞的 I-V 曲线, 每个点的值为 $\bar{x} \pm s$; D 为在 0 mV 时记录的两组 I_{Ca} 峰电流密度的比较。*** 表示 $P < 0.001$ (WT vs P817S)。

图2 *CACNA1C*-P817S 突变对 I_{Ca} 的影响



注: A 表示 WT 和 P817S 突变的 SSA 曲线; B 为两组 SSA 曲线半激活电压 $V_{1/2}$ 的比较; C 为两组 SSA 曲线斜率因子 k 的比较; D 表示 WT 和 P817S 突变的 SSI 曲线; E 为两组 SSI 曲线半激活电压 $V_{1/2}$ 的比较; F 为两组 SSI 曲线斜率因子 k 的比较。*** 表示 $P < 0.001$, NS 表示无统计学差异 (WT vs P817S)。

图3 *CACNA1C*-P817S 突变对 SSA 曲线和 SSI 曲线的影响



注:图 A 和 B 分别表示两组转染细胞荧光染色图像,黄色荧光显色部分代表 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白;图 C 表示两组细胞 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白外周荧光强度的绝对值比较;图 D 表示两组细胞 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白外周/整体荧光强度百分比的比较。**表示 $P < 0.01$ (WT vs P817S)。

图 4 共聚焦荧光显微镜下 HEK293 细胞 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白转运功能的比较

ERS 的电生理机制一直存在争议,但近来 Koncz 等^[19]的 ERS 实验模型为复极化假说提供了证据: I_{to} 是引起 1 期快速复极的主要跨膜电流,相对于心内膜,心外膜有更多的 I_{to} 通道;正常情况下,心外膜动作电位 1 相外向电流强于心内膜,因此心外膜在动作电位 1 相时表现为更为明显的切迹,而心内膜动作电位尖峰通常较细小,形成跨室壁的电位梯度,ERS 患者跨室壁电压梯度会增大,进而出现 J 点抬高、明显 J 波或 QRS 波群终末的顿挫;心动过缓时,迷走神经张力增加,可使 I_{K-ATP} 激活,导致心室 I_{to} 增强,诱发心动过缓相关性 J 波;而奎酮在增强 I_{Ks} 的同时抑制 I_{Ca} ,使外向电流明显增强,J 波振幅增高^[20-22]。因此 ERS 多见于男性青壮年,同时也有研究表明心动过缓和长间歇可使 J 波和 ST 段抬高更加明显^[23-24]。此外,LTCC 基因突变可使 ERS 患者 QT 间期相对缩短^[10]。本研究 ERS 先证者为一男性青年,临床特征与既往研究相符;既往无心搏骤停史,也否认 ERS 和心源性猝死家族史,但常规心电图可见多个导联 J 波抬高 ≥ 0.1 mV,甚至所有下壁和侧壁导联 V_4 均 ≥ 0.2 mV,同时多个导联可见 ST 段抬高,考虑可能为心动过缓相关性 J 波;先证者晕厥发生在运动过程中,而 ERP 又出现在心动过缓时,考虑可能是运动后恢复期迷走神经介导,类似于心动过缓性 J 波。Rosso 等^[6]发现,心电图存在 J 波的人群出现室颤的概率为 11/10 万,因此 ERS 的高度危险性引起了关注,早期筛查高危 ERS 人群尤为重要。ERS 高危因素有:(1)家族人群中存在 ERS,且具有不明原因的晕厥及猝死者;(2)可能出现过因室速或室颤导致的

晕厥或心脏事件;(3)当 QRS 波群终末部分出现顿挫,且 J 波明显抬高伴随 T 波倒置;(4)左室下壁、下侧壁或所有导联均出现 J 波或 ST 段抬高 ≥ 0.2 mV;(5)运动后恢复期迷走神经介导的 ST 段抬高也预示着恶性改变等^[1,25]。先证者下壁导联 J 波抬高均 ≥ 0.2 mV,同时又可能是运动后恢复期迷走神经介导,故先证者属于高危 ERS,可能有更高发生恶性心律失常的风险,需随访来进一步研究。先证者 QTc 为 367 ms,相对较短,推测为 LTCC 基因突变的可能性较大。通过二代测序技术,证实确为编码 LTCC $\alpha 1$ 亚单位 *CACNA1C* 发生了错义突变, c. 2449 C > T/p. P817S, MAF 为 0.002, PolyPhen-2 和 MetaLR 软件预测为有害突变。

LTCC 有 $\text{Ca}_v1.1$ 、 $\text{Ca}_v1.2$ 、 $\text{Ca}_v1.3$ 和 $\text{Ca}_v1.4$ 四种亚型,心肌细胞主要表达 $\text{Ca}_v1.2$ 亚型,由 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\alpha 2\delta$ 和/或 γ 亚基四种亚基组成。 $\alpha 1$ 亚基的编码基因是位于 12 号染色体上的 *CACNA1C*,为离子转运孔道,也是 LTCC 功能和药理学特性的决定性蛋白,但 LTCC 功能表达需 $\beta 2$ 和 $\alpha 2\delta$ 亚基的辅助,以提高细胞膜表达密度,顺应细胞内信使调控^[10,26]。*CACNA1C* 突变可导致长 Q-T 间期综合征、Brugada 综合征、ERS 以及短 Q-T 间期综合征。但在既往研究报道中,功能性缺失较少见。 $\text{Ca}_v1.2$ 羧基末端的突变可能对 $\text{Ca}_v1.2$ 功能表达和蛋白表达水平有明显作用,心脏疾病相关 *CACNA1C* 基因突变在 $\text{Ca}_v1.2$ 多见于羧基末端,且该区域的突变多产生功能丧失性效应,而发生在跨膜区域的突变较为少见^[10,27]。 I_{Ca} 大小不仅和离子通道活性有关,还与细胞膜上的通道数量有关,这取决于 $\text{Ca}_v1.2$ 蛋白的转

运功能。Antzelevitch 等^[28]发现 *CACNA1C*-A39V 突变导致的 I_{Ca} 功能性缺失是由于该突变降低了 $Ca_v1.2$ 蛋白的转运功能。如前所述, 奎酮在增强 I_{Ks} 的同时抑制 I_{Ca} , 使外向电流明显增强, J 波振幅增高。先证者为一名男性青年, 致病突变又为 LTCC 基因突变, 理论上, 奎酮和 *CACNA1C* 突变的双重作用, 会使临床症状更明显和更严重, 但目前症状表明并没有, 可能是因为在个人易感性的可能, 当然, 这也在一定程度上提示了该先证者有症状恶化的可能, 需密切注意。既往研究发现, *CACNA1C* 突变可使 I_{Ca} 功能缺失, 从而表现为 ERS^[10]。本研究通过全细胞膜片钳技术对 *CACNA1C*-P817S 进行功能学研究, 结果显示 P817S 突变可降低 I_{Ca} 密度, 加速 LTCC 的失活, 但并未改变激活。为进一步研究 I_{Ca} 密度的降低是否是 $Ca_v1.2$ 蛋白转运功能降低所致, 本研究通过共聚焦荧光显微镜技术, 通过对 $Ca_v1.2$ 蛋白转运功能进行分析, 发现 P817S 突变可使 $Ca_v1.2$ 蛋白转运功能降低, 于是可对细胞电生理结果中 P817S 突变组中 I_{Ca} 密度的降低作出较为合理的解释: P817S 突变通过降低 $Ca_v1.2$ 蛋白的转运功能, 使细胞膜上有效 $Ca_v1.2$ 蛋白数量减少, 从而降低了 I_{Ca} 的密度。

综上, 本研究通过对 ERS 先证者进行基因筛查, 发现一个新的基因突变 *CACNA1C*-P817S, 通过功能分析证实为功能缺失性突变, 该突变通过降低 $Ca_v1.2$ 蛋白的转运功能, 使细胞膜上有效 $Ca_v1.2$ 蛋白数量减少, 从而降低了 I_{Ca} 的密度。本研究结果提示, *CACNA1C*-P817S 突变为 ERS 的一个致病基因, 明确 ERS 的分子遗传学和功能学基础可为其诊断和治疗提供一定的依据。

4 限制与不足

本研究的局限性是缺乏来自先证者的诱导性多能干细胞衍生的心肌细胞以及进一步的体内研究, 而这对于解释复杂遗传变异的累积效应是优选。另一局限性是, 本研究缺乏蛋白定量相关的研究, 这可能在部分程度上对试验结果造成偏倚。

参考文献

- [1] Antzelevitch C, Yan GX, Ackerman MJ, et al. J-wave syndromes expert consensus conference report: emerging concepts and gaps in knowledge [J]. *Europace*, 2017, 19(4): 665-694.
- [2] Bourier F, Denis A, Cheniti G, et al. Early repolarization syndrome: diagnostic and therapeutic approach [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 169.
- [3] Gussak I, Antzelevitch C. Early repolarization syndrome: clinical characteristics and possible cellular and ionic mechanisms [J]. *J Electrocardiol*, 2000, 33(4): 299-309.
- [4] Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F, et al. Sudden cardiac arrest associated with early repolarization [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2016-2023.
- [5] Nam GB, Kim YH, Antzelevitch C. Augmentation of J waves and electrical storms in patients with early repolarization [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2078-2079.
- [6] Rosso R, Kogan E, Belhassen B, et al. J-point elevation in survivors of primary ventricular fibrillation and matched control subjects: incidence and clinical significance [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(15): 1231-1238.
- [7] Ali A, Butt N, Sheikh AS. Early repolarization syndrome: a cause of sudden cardiac death [J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(8): 466-475.
- [8] Mahida S, Derval N, Sacher F, et al. History and clinical significance of early repolarization syndrome [J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(1): 242-249.
- [9] Barajas-Martinez H, Hu D, Ferrer T, et al. Molecular genetic and functional association of Brugada and early repolarization syndromes with S422L missense mutation in KCNJ8 [J]. *Heart Rhythm*, 2012, 9(4): 548-555.
- [10] Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, et al. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death [J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(12): 1872-1882.
- [11] Chen Y, Barajas-Martinez H, Zhu D, et al. Novel trigenic *CACNA1C*/DES/MYPN mutations in a family of hypertrophic cardiomyopathy with early repolarization and short QT syndrome [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 78.
- [12] Hu D, Barajas-Martinez H, Terzic A, et al. ABC9 is a novel Brugada and early repolarization syndrome susceptibility gene [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 171(3): 431-442.
- [13] Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, et al. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4(6): 874-881.
- [14] Hu D, Barajas-Martinez H, Pfeiffer R, et al. Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 64(1): 66-79.
- [15] Takayama K, Ohno S, Ding WG, et al. A de novo gain-of-function KCND3 mutation in early repolarization syndrome [J]. *Heart Rhythm*, 2019, 16(11): 1698-1706.
- [16] Kline J, Costantini O. Inherited cardiac arrhythmias and channelopathies [J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103(5): 809-820.
- [17] 李翠兰, 胡大一. 心脏离子通道病引起的晕厥 [J]. *心血管病学进展*, 2006, 27(4): 407-412.
- [18] Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. HRS/EHRA/APHR expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes [J]. *Heart Rhythm*, 2013, 10(12): 1932-1963.
- [19] Konec I, Gurabi Z, Patoeckai B, et al. Mechanisms underlying the development of the electrocardiographic and arrhythmic manifestations of early repolarization syndrome [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 68: 20-28.
- [20] Patoeckai B, Barajas-Martinez H, Hu D, et al. Cellular and ionic mechanisms underlying the effects of cilostazol, milrinone, and isoproterenol to suppress arrhythmogenesis in an experimental model of early repolarization syndrome [J]. *Heart Rhythm*, 2016, 13(6): 1326-1334.
- [21] Nam GB, Ko KH, Kim J, et al. Mode of onset of ventricular fibrillation in patients with early repolarization pattern vs. Brugada syndrome [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(3): 330-339.
- [22] Argenziano M, Tiscornia G, Moretta R, et al. Arrhythmogenic effect of androgens on the rat heart [J]. *J Physiol Sci*, 2017, 67(1): 217-225.
- [23] Noseworthy PA, Tikkanen JT, Porthan K, et al. The early repolarization pattern in the general population: clinical correlates and heritability [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(22): 2284-2289.
- [24] Aizawa Y, Sato A, Watanabe H, et al. Dynamicity of the J-wave in idiopathic ventricular fibrillation with a special reference to pause-dependent augmentation of the J-wave [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(22): 1948-1953.
- [25] Talib AK, Sato N, Kawabata N, et al. Repolarization characteristics in early repolarization and Brugada syndromes: insight into an overlapping mechanism of lethal arrhythmias [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2014, 25(12): 1376-1384.
- [26] 娄奇, 李为民. $Ca_v1.2$ 在心律失常中作用的研究进展 [J]. *心血管病学进*

展,2019,40(6):919-923.

- [27] Venetucci L, Denegri M, Napolitano C, et al. Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2012, 9(10):561-575.
- [28] Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, et al. Loss-of-function mutations in

the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death[J]. *Circulation*, 2007, 115(4):442-449.

收稿日期:2020-10-09

(上接第 444 页)

- [12] Fox J, Fiechter R, Gerstl P, et al. Mechanical versus manual chest compression CPR under ground ambulance transport conditions[J]. *Acute Card Care*, 2013, 15(1):1-6.
- [13] Zhu N, Chen Q, Jiang Z, et al. A meta-analysis of the resuscitative effects of mechanical and manual chest compression in out-of-hospital cardiac arrest patients[J]. *Crit Care*, 2019, 23(1):100.
- [14] Casner M, Andersen D, Isaacs SM. The impact of a new CPR assist device on rate of return of spontaneous circulation in out-of-hospital cardiac arrest[J]. *Prehosp Emerg Care*, 2005, 9(1):61-67.
- [15] Gao C, Chen Y, Peng H, et al. Clinical evaluation of the AutoPulse automated chest compression device for out-of-hospital cardiac arrest in the northern district of Shanghai, China[J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(3):563-570.
- [16] Chen W, Weng Y, Wu X, et al. The effects of a newly developed miniaturized mechanical chest compressor on outcomes of cardiopulmonary resuscitation in a porcine model*[J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(11):3007-3012.
- [17] Lurie KG, Zielinski TM, McKnite S, et al. Use of an inspiratory impedance valve improves neurologically intact survival in a porcine model of ventricular fibrillation[J]. *Circulation*, 2002, 105(1):124-129.
- [18] Wolcke BB, Mauer DK, Schoefmann MF, et al. Comparison of standard cardiopulmonary resuscitation versus the combination of active compression-decompression cardiopulmonary resuscitation and an inspiratory impedance threshold device for out-of-hospital cardiac arrest[J]. *Circulation*, 2003, 108(18):2201-2205.
- [19] Lurie KG, Barnes TA, Zielinski T, et al. Evaluation of a prototypic inspiratory impedance threshold valve designed to enhance the efficiency of cardiopulmonary resuscitation[J]. *Respir Care*, 2003, 48(1):52-57.
- [20] Sugiyama A, Duval S, Nakamura Y, et al. Impedance threshold device combined with high-quality cardiopulmonary resuscitation improves survival with favorable

neurological function after witnessed out-of-hospital cardiac arrest[J]. *Circ J*, 2016, 80(10):2124-2132.

- [21] Noc M, Radsel P. Urgent invasive coronary strategy in patients with sudden cardiac arrest[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2008, 14(3):287-291.
- [22] Ji F, Li Z, Nguyen H, et al. Perioperative dexmedetomidine improves outcomes of cardiac surgery[J]. *Circulation*, 2013, 127(15):1576-1584.
- [23] Mohler MJ, Wendel CS, Mosier J, et al. Cardiocerebral resuscitation improves out-of-hospital survival in older adults[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2011, 59(5):822-826.
- [24] Johnson B, Runyon M, Weekes A, et al. Team-focused cardiopulmonary resuscitation; prehospital principles adapted for emergency department cardiac arrest resuscitation[J]. *J Emerg Med*, 2018, 54(1):54-63.
- [25] Pearson DA, Darrell Nelson R, Monk L, et al. Comparison of team-focused CPR vs standard CPR in resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest; results from a statewide quality improvement initiative[J]. *Resuscitation*, 2016, 105:165-172.
- [26] Stoppyra JP, Courage C, Davis CA, et al. Impact of a "team-focused CPR" protocol on out-of-hospital cardiac arrest survival in a rural EMS system[J]. *Crit Pathw Cardiol*, 2016, 15(3):98-102.
- [27] Daniel MR, Timmy L, Casey O, et al. Mechanical, team-focused, video-reviewed cardiopulmonary resuscitation improves return of spontaneous circulation after emergency department implementation[J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(6):e014420.
- [28] Couper K, Yeung J, Nicholson T, et al. Mechanical chest compression devices at in-hospital cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis[J]. *Resuscitation*, 2016, 103:24-31.

收稿日期:2020-12-27