

RyR2 基因突变所致 CPVT 的研究进展

刁小川¹ 李健² 郑娜³

[摘要] 作为一种罕见的遗传性疾病,儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速(catecholaminergic polymorphous ventricular tachycardia,CPVT)被视为心源性猝死的重要原因之一。大量研究发现,Ryanodine 受体 2(RyR2)基因突变可以导致 CPVT。RyR2 是存在于心肌细胞肌浆网上的一种钙释放通道,其调控异常、结构改变等均可导致心肌细胞自发性 Ca²⁺ 泄漏,引发多种心脏疾病,严重时可出现心力衰竭,甚至猝死。本文主要综述 RyR2 基因突变与 CPVT 的关系,以及将 RyR2 作为靶点的 CPVT 临床治疗及法医学诊断价值。

[关键词] 儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速;Ryanodine 受体 2;基因突变

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.04.023

[中图分类号] R541.7 [文献标志码] A

Research advances in CPVT caused by the gene mutation of RyR2

DIAO Xiaochuan¹ LI Jian² ZHENG Na³

(¹The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin, 150000, China; ²Pukou Branch of Nanjing Municipal Public Security Bureau; ³Department of Pathology, School of Medicine, Shenzhen University)

Corresponding author: ZHENG Na, E-mail: zhengna@szu.edu.cn

Summary As a rare hereditary disease, catecholaminergic polymorphous ventricular tachycardia (CPVT) is considered as a major cause of sudden unexpected cardiac death. Amount of research have reveal that the gene mutations of Ryanodine receptor 2 (RyR2) was recognized as a part of the pathophysiology of CPVT. The RyR2, a Ca²⁺ release channel on the sarcoplasmic reticulum, plays a key role in the event of spontaneous Ca²⁺ leakage and sequential cardiac disease, even heart failure and sudden cardiac death, which was mainly due to the abnormal regulation and structural modifications of RyR2. In the present article, we present an overview of the advances in the gene mutations of RyR2 in CPVT and discuss the implications of the findings for CPVT therapy and forensic diagnosis.

Key words catecholaminergic polymorphous ventricular tachycardia; Ryanodine receptor 2; Gene mutation

儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速(catecholaminergic polymorphous ventricular tachycardia, CPVT)被公认是一种猝死率较高的遗传性心律失常性疾病,多在机体摄入药物、运动及情绪压力下发病。研究发现,大多数 CPVT 患者携带兰尼碱受体 2(Ryanodine receptor 2, RyR2)基因突变,从而影响 RyR2 构象稳定,导致其介导的钙释放通道开放/关闭功能异常,此类患者被归类为 CPVT-1 型,临床上表现为致命性的双向或多形性室性心动过速(室速)等心律失常。因此,对于 RyR2 的深入认识,既有利于阐明 CPVT 的发病机制,更有利于研发靶向性药物,降低病死率。

1 RyR2 的分子结构、功能及其调节机制

1.1 RyR2 的分子结构

RyRs 是细胞内的一种钙释放通道蛋白,因可以与生物碱兰尼碱结合而得名。哺乳动物的 RyR 主要有 3 种亚型: RyR1、RyR2 及 RyR3,其中 RyR2 主要表达于心肌^[1]。

RyR2 是目前发现的最大的细胞内离子通道蛋白,位于肌浆网膜,是离子通透孔道的同源四聚体。该蛋白一级结构由 4 967 个氨基酸的多肽链构成,跨膜段位于羧基端,主要功能为调节 Ca²⁺ 的进出,其外的 80%氨基酸序列编码胞质区域;二级结构包含由 3 个亮氨酸/异亮氨酸重复序列构成的 α 螺旋,作为调节通道的亚基,并为酶提供支架^[2]。

1.2 RyR2 的调节蛋白及作用机制

RyR2 介导的钙释放通道作为大分子复合物,既与多种小分子结合并受其调节,又同时受多种蛋白激酶调控,共同参与其生理功能。

1.2.1 FK506 结合蛋白 12.6 他克莫司(FK506)结合蛋白 12.6 (FK506 binding protein, FKBP12.6) 的分子量为 12.6 kD,因可与免疫抑制剂 FK506 结合而得名,又名 Ca²⁺ 通道稳定结合蛋白 2(Calstabin 2)。RyR2 上存在多个 FKBP12.6 的特异性结合位点,主要位于 N 末端(1815~1855)和 C 末端,其中研究最深入的是 Ile2427。Ile2427 主要影响 RyR2 对 FKBP12.6 的选择性,若将其替换为位于 RyR1 上的 Val,则无法与 FKBP12.6 结合,这或许解释了心肌细胞中 FKBP12.6 含量较低,却仍可竞争性地与 RyR2 结合^[3-4]。

¹哈尔滨医科大学第一临床医学院(哈尔滨,150000)

²南京市公安局浦口分局

³深圳大学医学部基础医学院病理学教研室

通信作者:郑娜, E-mail: zhengna@szu.edu.cn

FKBP12.6 具有稳定 RyR2 通道的作用,二者结合后,可以稳定 RyR2 的关闭状态,防止 Ca^{2+} 外流,大多数引起 RyR2 功能异常的突变集中于 RyR2 的 FKBP12.6 结合域与跨膜域。但也有研究质疑 FKBP12.6 对 RyR2 的调节作用,当应激(咖啡因、 Ca^{2+})条件下,FKBP12.6 缺失对释放电流大小的影响并不显著,对 RyR2 的激活也无明显影响。鉴于此,FKBP12.6 对突变的 RyR2 的调节作用及其与 Ca^{2+} 释放的关系尚需进一步明确。

1.2.2 蛋白激酶 A 及钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II

儿茶酚胺类物质可以活化 β -肾上腺素受体,从而活化 GTP 结合蛋白(GTP binding protein, Gs),后者进一步活化腺苷酸环化酶,引起胞内环磷酸腺苷(cAMP)浓度增高,激活蛋白激酶 A(PKA)。PKA 全酶由两个催化亚基与两个调节亚基构成,通过 A 型激酶锚定蛋白(A-kinase anchor protein, AKAP)与 RyR2 结合。PKA 主要通过调节亚基与 cAMP 相互作用使 RyR2 活化,引起 Ser2815 等位点磷酸化,该过程对心肌细胞内 Ca^{2+} 释放的调节起重要作用^[5]。PKA 浓度若长时间维持较高水平,则引起 RyR2 过度磷酸化,出现舒张期 Ca^{2+} 漏流,诱发心律失常。

与 PKA 相似,钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMK II)通过调控 RyR2 磷酸化实现对细胞肌浆网钙释放的调控。CaMK II 是一种六聚体全酶,与 Ca^{2+} 结合后被激活,活化的 CaMK II 可以通过 RyR2 Ser2815 位点磷酸化提高通道活性,此过程并不引起 FKBP12.6 与 RyR2 解离^[6]。

1.2.3 磷脂酶 4D3、蛋白磷酸酶 1 和 2 与上述多种酶不同,磷脂酶 4D3(PDE4D3)并不直接调节 RyR2 活性,而是通过反馈性调节 PKA 酶的活性实现的。PDE4D3 通过肌肉特化锚定蛋白激酶(mAKAP)和 RyR2 结合,PKA 通过磷酸化 PDE4D3 提高其活性及其与 mAKAP 的亲和力。相反的是,蛋白磷酸酶 1(PP1)和 2(PP2a)可以降低 RyR2 活性,其分别通过 spinophilin 和 PR130 与 RyR2 结合,引起 RyR2 脱磷酸化,其中 PP1 与 Ser2808 及 Ser2814 位点的脱磷酸化密切相关;而 PP2a 仅与 Ser2814 的脱磷酸化相关^[7]。

1.2.4 连接素、triadin 和钙集蛋白 钙集蛋白是一种低亲和力、高容量的钙结合蛋白,通常情况下与连接素和 triadin 构成复合体,起到稳定 RyR2 的作用,当细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,复合体稳定性降低,导致 RyR2 异常开放, Ca^{2+} 释放增加^[8]。

2 RyR2 基因突变引起 CPVT 的机制

2.1 RyR2 基因突变致 CPVT 概述

CPVT 又称为家族性多形性室速(familial polymorphic ventricular tachycardia, FPVT),最早报道于 1970 年,患者猝死率可高达 30%~50%。

大多数患者少年时开始出现症状,发作时表现为运动或情绪激动等交感神经兴奋诱发的面色苍白、头晕乏力,严重则出现意识丧失,同时伴有抽搐、大小便失禁等,部分患者数秒或数分钟后意识可自行恢复而容易被忽视。静息状态下,患者心电图无明显异常,仅为心率偏慢;发作时,心电图多呈特征性的双向室速,也可呈多形性室速或心律失常。在运动负荷试验中,心率超过 120 次/min 后开始出现室性期前收缩,逐渐增多呈二联律或三联律,最终表现为双向或多形性室速。当运动停止,即逐渐转为室性期前收缩,最终恢复至窦性心律。临床上,长 QT 综合征(LQT)、心律失常性右室心肌病(ARVC)也可在运动或情绪激动时出现多形性或双向室速,但前者的心电图可出现 QTc 间期延长;后者右胸导联可见 Epsilon 波,长期病变可在影像学检查示右室扩张、脂肪组织浸润及室壁运动异常等。当上述几种疾病临床表现相似,且均无器质性心脏改变时,除了心电图检查,基因筛查也有利于 CPVT 的鉴别诊断^[9]。

CPVT 有明显的家族聚集性,属于常染色体遗传性疾病,有显性和隐性两种遗传形式,其中显性遗传类型与 RyR2 突变密切相关。

本世纪初发现 CPVT 常染色体显性遗传的模式,确定其致病基因定位于 1 号染色体 q13~q21。后续研究发现, RyR2 基因点突变(P2328S、Q4201R、V4653F 及 S2246L、R2474S、N4104K、R4497C)均可引发 CPVT。目前已发现至少 130 种 RyR2 突变可导致 CPVT,但尚未发现 RyR2 移码突变或无义突变与之相关。总的来说, RyR2 突变高发于 N 端(codons 44~466)、中央区(codons 2246~2534)及 C 端通道形成区(codons 3778~4959),与 CPVT 相关的突变主要位于 C 端及 N 端中心区^[10-11]。

2.2 RyR2 基因突变致 CPVT 的分子机制

RyR2 突变致心律失常的主要机制是 Ca^{2+} 稳态失衡,大多数与 CPVT 相关的 RyR2 基因突变都可令 RyR2 功能显著增强,大量 Ca^{2+} 内流造成钙超载,进一步导致钠钙交换体活性增强,产生的瞬态内向电流常可导致延迟后除极,从而引起心脏功能异常^[12]。

目前研究较为明确的 RyR2 突变体功能包括:①突变体于刺激原存在时过度磷酸化, Ca^{2+} 通道开放频率增加,引起 Ca^{2+} 释放量增加;②突变体内部结构相互作用,引起自发性 Ca^{2+} 释放;③突变体与 FKBP12.6 的亲和力下降导致 FKBP12.6 对于 RyR2 的稳定作用下降, Ca^{2+} 通道开放程度增加从而使 Ca^{2+} 释放量增加。

Jiang 等发现 RyR2 基因 R4496C 突变体(人 R4497C 突变), Ca^{2+} 浓度较低时, Ca^{2+} 通道基础活

性增加, Ca^{2+} 对咖啡因的敏感性增加。将带阴性电荷的谷氨酸代替 4496 位携阳性电荷的精氨酸, 通道活性进一步增加, 而带阳性电荷的赖氨酸无此效果, 说明突变令该位点带负电荷, 导致通道在低钙条件下无法保持关闭, 引发钙漏流。Priori 等^[13]也证明 R4497C 位点突变使 Ca^{2+} 释放增加, 使钙通道开放所需的电压阈值下降, 引起心肌延缓后去极, 引起心律失常。

突变位点为 P2328S、Q4201R、V4653F、S2246L、R2474S、N404K 及 R4497C/R4496C, 运动或精神因素刺激 PKA 磷酸化, 增加 RyR2 的敏感性, 引发舒张期钙漏流, 该症状与 CPVT 患者的临床表型相符^[14]。

突变位点为 S2246L、R4497C 或 N4104K, 突变型细胞在咖啡因或异丙肾上腺素的刺激下, 可出现内钙释放增加的现象。咖啡因激活的 RyR2 与 FKBP 的相互作用不受激活剂的影响, 但可以引起 RyR2 过度磷酸化, 提升胞质 cAMP 含量, 极度削弱 RyR2 与 FKBP12.6 的相互作用, 降低 RyR2 稳定性, 影响细胞 Ca^{2+} 稳态。

突变位点为 R169Q、L2534V 及 FKBP12.6 结合域, RyR2 对 FKBP12.6 的亲合性下降, 钙通道活性增高, 引起心律失常。

但并非所有 RyR2 致病突变均有严重的疾病表现, 例如突变位点为 R420W, 患者仅出现轻微症状。西班牙的一个家族中有 176 人的 RyR2 检测出 G357S 突变, 其中 72% 在运动测试后未出现复杂性心律失常, 可能是致病基因表达水平下调导致疾病症状缓解。

3 RyR2 基因对 CPVT 的治疗启示

目前, RyR2 基因介导的 CPVT 发病具体机制尚未完全明确, 但仍可通过基因筛查对患者及其家系成员进行疾病预防和遗传管理, 并具有将 RyR2 基因突变作为治疗靶点的临床价值。

研究显示, 肾上腺素能活性增加是诱发 CPVT 的危险因素之一, 而将 β -肾上腺素能阻断剂作为 CPVT 患者的一线治疗药物, 其主要作用机制为直接抑制 RyR2 的钙释放, 以及间接抑制钠钙交换体的活性, 但治疗效果个体差异较大, 可能由于患者 RyR2 基因突变的个体差异, 因此明确基因突变类型有望成为个体化治疗的分子基础^[15]。

对于 β 受体阻滞剂治疗效果欠佳的 CPVT 患者, 临床上常用 RyR2 阻滞剂丁卡因和氟卡尼进行治疗, 最初认为其作用机制为直接抑制 RyR2, 但新近研究认为机制可能是间接性地抑制钠钙交换^[16]。

如前所述, FKBP12.6 与 RyR2 及 CPVT 关系密切, 1,4-苯并噻氮类物质质的多种衍生物均在 CPVT 治疗中通过 FKBP12.6 与 RyR2 发挥作用。

目前已经明确的 JTV519 通过促进 FKBP12.6 与 RyR2 结合, 使基因突变的 RyR2 通道开放恢复到野生型水平, 而衍生物 ARM036 已经进入临床 II 期试验阶段, 有望作为 CPVT 的临床治疗药物^[17]。

与 JTV519 的功能截然不同, 丹曲洛林可以阻止骨骼肌的肌浆网异常钙漏流, 还可以通过纠正 RyR2 突变导致的异常结构间的结拉链作用, 减少钙漏流, 有望和 JTV519 联合应用, 进一步增强 CPVT 的治疗效果。

4 总结与展望

近年来, 对于 RyR2 基因突变的研究不断深入, 对其与 CPVT 的关系有了更深层次的认识, 随着基因技术的发展及应用普及, RyR2 不仅有望作为重要靶点应用于 CPVT 的诊疗中, 有效改善 CPVT 的临床症状, 降低 CPVT 引起的猝死, 也有望在猝死后的法医病理学鉴定中起到辅助作用。众所周知, 因 CPVT 死亡的患者可能出现阴性解剖, 而死后的基因水平检测可以在分子水平提供法医学证据。

参考文献

- [1] Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(11): a004242.
- [2] Amador FJ, Stathopoulos PB, Enomoto M, et al. Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies[J]. FEBS J, 2013, 280(21): 5456-5470.
- [3] Zhao YT, Guo YB, Gu L, et al. Sensitized signaling between L-type Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(3): 332-342.
- [4] O'Brien F, Venturi E, Sitsapesan R. The ryanodine receptor provides high throughput Ca^{2+} -release but is precisely regulated by networks of associated proteins: a focus on proteins relevant to phosphorylation[J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(3): 426-433.
- [5] Bovo E, Huke S, Blatter LA, et al. The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca^{2+} leak in ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 104: 9-16.
- [6] Bobin P, Varin A, Lefebvre F, et al. Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca^{2+} waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors[J]. Cardiovasc Res, 2016, 110(1): 151-161.
- [7] Kushnir A, Marks AR. The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease[J]. Adv Pharmacol, 2010, 59: 1-30.
- [8] Handhke A, Ormonde CE, Thomas NL, et al. Claquestrin interacts directly with the cardiac ryanodine receptor luminal domain[J]. J Cell Sci, 2016, 129(21): 3983-3988.

• 病例报告 •

起搏器植入术后 T 波记忆现象 1 例

王浩¹ 刘善伟¹

[关键词] T 波记忆;起搏器植入;心电向量
doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.04.024
[中图分类号] R541.7 [文献标志码] D

T wave memory after a pacemaker implantation: a case report

WANG Hao LIU Shanwei

(Department of Cardiac Diagnosis and Treatment, Beijing Royal Integrative Medicine Hospital, Beijing, 102200, China)

Corresponding author: LIU Shanwei, E-mail: Liushanwei135135@163.com

Summary Cardiac memory is a unique phenomenon of electrical remodeling characterized by marked diffuse T-wave inversions (TWD) that can be misdiagnosed as myocardial ischemia. Misdiagnosis of cardiac memory can be easily result in unnecessary diagnostic investigations or therapeutic interventions. We report a case of T wave memory after a pacemaker implantation in acute inferior myocardial infarction.

Key words T wave memory; pacemaker implantation; electrocardial vector

1 病例资料

患者,男,76岁。因“胸痛3h”入院。入院前3h因外出散步时突感胸痛,持续不可缓解,由急救车送入我院急诊科。入院体检:体温35.8℃,脉搏32次/min,呼吸23次/min,血压100/60mmHg(1mmHg=0.133kPa),意识模糊,体型略胖,双肺呼吸音粗,未闻及干湿啰音,心界不大,心律齐,心率32次/min,腹软,无压痛及反跳痛,肝脾肋下未触及,生理反射存在,病理反射未引出。心电图示

窦性心律,三度房室阻滞,Ⅱ、Ⅲ、aVF导联ST段抬高。急查肌钙蛋白I(TnI)0.42μg/L。于急诊植入临时起搏器,右心室心尖起搏,频率70次/min。急诊推入我院导管室,行急诊CAG+PCI术,术中可见右冠状动脉(冠脉)中段及远端完全闭塞,TMI血流0级。考虑本次罪犯血管为右冠脉,故决定开通右冠脉(图1)。患者术后返回病房,行心电图示:起搏心律,右室心尖起搏(图2)。

患者冠脉开通后,暂时关闭临时起搏器,复查心电图示:窦性心律,右束支传导阻滞,Ⅱ、Ⅲ、aVF、V₁₋₄导联T波倒置(图3)。次日早晨复查心

¹北京王府中西医结合医院心脏诊疗科(北京,102200)
通信作者:刘善伟,E-mail:Liushanwei135135@163.com

[9] 郭继鸿. 原发遗传性心律失常的诊治精要[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(11): 1141-1146.

[10] Venetucci L, Denegri M, Napolitano C, et al. Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias[J]. Nat Rev Cardiol, 2012, 9(10): 561-571.

[11] Priori SG, Chen SR. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis[J]. Circ Res, 2011, 108(7): 871-883.

[12] Zhao YT, Valdivia CR, Gurrola GB, et al. Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies[J]. Sci China Life Sci, 2015, 58(1): 54-58.

[13] Priori SG, Napolitano C. Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca²⁺ release channels[J]. J Clin Invest, 2005, 115(8): 2033-2038.

[14] Meli AC, Refaat MM, Dura M, et al. A novel ryanodine receptor mutation linked to sudden death increases sensitivity to cytosolic calcium[J]. Circ Res, 2011, 109(3): 281-290.

[15] Leren IS, Saberniak J, Majid E, et al. Nadolol decreases the incidence and severity of ventricular arrhythmias during exercise stress testing compared with beta1-selective beta-blockers in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia [J]. Heart Rhythm, 2016, 13(2): 433-440.

[16] Bannister ML, Thomas NL, Sikkell MB, et al. The mechanism of flecainide action in CPVT does not involve a direct effect on RyR2[J]. Circ Res, 2015, 116(8): 1324-1335.

[17] Thevis M, Schänzer W. Analytical approaches for the detection of emerging therapeutics and non-approved drugs in human doping controls[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 101: 66-83.

(收稿日期:2017-11-01)