

先天性心脏病患者 GATA4 基因突变谱分析

董斌斌 郑桂芬 赵 红 魏 东 刘兴元

【摘要】 目的:分析先天性心脏病患者 GATA4 基因的突变谱,揭示先天性心脏病的分子病因。 方法:收集 110 例无血缘关系的先天性心脏病患者的临床资料和血标本,以 100 名无血缘关系的健康者为对照。应用聚合酶链反应扩增先天性心脏病相关基因 GATA4 的全部编码外显子和外显子两侧的部分内含子,采用双脱氧核苷链末端合成终止法对全部扩增片段进行测序。将所测的序列与 GenBank 数据库中的 GATA4 基因序列进行比对,识别出 GATA4 基因突变,并用序列比对在线软件 ClustalW2 分析突变氨基酸的保守性。 结果:在 3 例无血缘关系的先天性心脏病患者的 GATA4 基因各识别出 1 个新的杂合错义突变,即 P42T、V48M 和 S191I 突变,这些突变不存在于正常对照者,而且突变氨基酸在哺乳动物进化上有高度的保守性。 结论:该研究结果可能揭示了先天性心脏病新的分子病因,有助于先天性心脏病患者的早期防治。

【关键词】 先天性心脏病;遗传学;转录因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.01.015

Mutational analysis of the GATA4 gene in patients with congenital heart disease DONG Bin-bin , ZHENG Gui-fen, ZHAO Hong, WEI Dong, LIU Xing-yuan. Department of Paediatrics, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China

【Abstract】 Objective: To perform the mutational analyses of the GATA4 gene in patients with congenital heart disease (CHD) in order to identify novel molecular etiology responsible for CHD.

Methods: A cohort of 110 unrelated subjects with CHD and a total of 100 unrelated healthy individuals used as controls were recruited. The clinical datum were collected and the peripheral venous blood specimens were prepared. The genomic DNA was extracted from the peripheral blood lymphocytes. The entire coding exons and flanking partial introns of the GATA4 gene were amplified by polymerase chain reaction and the amplicons were sequenced using the di-deoxynucleotide chain termination procedure. The acquired sequences were aligned with those of GATA4 publicized in GenBank by the aid of program BLAST to identify the sequence variations. The online software ClustalW2 was used to ascertain whether the altered amino acids were evolutionarily conservative across species. **Results:** Three novel heterozygous missense mutations of GATA4, p. P42T, p. V48M, and p. S191I, were identified in 3 out of 110 unrelated CHD patients, respectively. The mutations were absent in the control individuals. The altered amino acids were highly conservative evolutionarily among mammals. **Conclusion:** These findings expand the mutation spectrum of GATA4 linked to CHD and reveal novel molecular defects associated with CHD, contributing to the early prophylaxis and timely therapy for CHD.

【Key words】 Congenital heart disease; Genetics; Transcriptional factor

心脏是胚胎发育过程中最早形成的功能器官,

心脏发育是一个极其复杂的生物学过程,受许多基因包括转录因子编码基因如 GATA4、CSA 和 GATA6 等的调控^[1]。在心脏发育过程中,任何一个环节异常都有可能导致先天性心脏畸形。先

基金项目:上海市自然科学基金(10ZR1433100)

作者单位:200065 上海,同济大学医学院附属同济医院儿科

通信作者:刘兴元,Email: liuxingyuan402@hotmail.com

先天性心脏病是临床上最常见的出生缺陷,其中又以室间隔缺损和房间隔缺损最为常见,已成为婴幼儿非感染死亡最主要原因^[2]。尽管手术或导管介入治疗显著改善了患者的预后,但由遗传缺陷所致的先天性心脏病患者即使缺损得到了修补,畸形得到了纠正,血流动力学恢复正常,其心脏依然会继续受到遗传缺陷的危害而功能受损,心律失常甚至猝死的发生率仍较高^[3-5]。因此,识别遗传缺陷对先天性心脏病的防治具有重要的临床意义。目前已经发现了多个基因与先天性心脏病有关,其中 GATA4 就是最常见的致病基因之一。源于生殖细胞和体细胞的 GATA4 突变均可导致先天性心脏病,而且部分突变的致病机制已被体内、外研究所证实^[6-9]。然而,由于先天性心脏病具有显著的遗传异质性,有必要在不同种人群中对 GATA4 基因进行研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究对象为 2007 年 3 月—2010 年 2 月住院接受手术或导管介入修补治疗的 110 例无血缘关系的先天性心脏病患者,男性 48 例,女性 62 例,年龄

2~23 岁,平均(5.6±3.0)岁。其中室间隔缺损 46 例,房间隔缺损 39 例,法洛四联症 21 例,动脉导管未闭和房室间隔缺损各 2 例。对照组为 100 名无血缘关系的健康人。临床评估包括详细病史、全面体检、心脏超声、心电图和胸部 X 线片。经知情同意后取外周静脉血 2 ml,置于抗凝管中,混匀后-80℃冰箱冻存备用。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 使用基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 抽提试剂盒 (Wizard Genomic DNA Extraction Kit, Promega) 抽提外周静脉血 gDNA。

1.2.2 扩增 GATA4 基因外显子及其两侧部分内含子的引物设计及合成 根据 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中 GATA4 基因的 gDNA 序列(登录号:NC_000008),利用在线软件 Primer 3.0(<http://frodo.wi.mit.edu/>) 计算机辅助在线设计 7 对引物(第 1 个编码外显子因较大而设计 2 对引物扩增以便于测序),由上海生物工程公司合成。所设计的引物序列见表 1。

表 1 扩增 GATA4 基因编码外显子及其两侧部分内含子的引物

| 外显子 | 正向引物 (5'→3') | 反向引物 (5'→3') | 扩增片段(bp) |
|-----|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| 2-a | GAT, CTT, CGC, GAC, AGT, TCC, TC | GTC, CCC, GGG, AAG, GAG, AAG | 458 |
| 2-b | GCT, GGG, CCT, GTC, CTA, CCT | AAA, AAC, AAG, AGG, CCC, TCG, AC | 554 |
| 3 | GGG, CTG, AAG, TCA, GAG, TGA, GG | GAT, GCA, CAC, CCT, CAA, GTT, CC | 437 |
| 4 | GAG, ATC, TCA, TGC, AGG, GTC, GT | GCC, CCT, TCC, AAA, TCT, AAG, TC | 390 |
| 5 | TCT, TTC, TCG, CTG, AGT, TCC, AG | GGG, ATG, TCC, GAT, GCT, GTC | 379 |
| 6 | GCC, ATC, CCT, GTG, AGA, ACT, GT | GAG, GGT, AGC, TCA, CTG, CTT, GC | 444 |
| 7 | AAG, TGC, TCC, TTG, GTC, CCT, TC | TTC, CCC, TAA, CCA, GAT, TGT, CG | 479 |

1.2.3 GATA4 基因目的片段的扩增 以 gDNA 为模板,使用 HotStar Taq DNA 聚合酶等聚合酶链反应(PCR)试剂(Qiagen),分别使用上述 7 对引物在 PTC-220 型 PCR 仪(MJ Research)上扩增目的基因片段。PCR 的反应体系为 25 μl,其中 10× Buffer 2.5 μl,5× Q 液 5.0 μl,dNTP (2.5 mM) 2.0 μl,gDNA (100 ng/μl) 1 μl,上、下游引物(20 μM)各 0.5 μl,双蒸水 13.25 μl,HotStar Taq DNA 聚合酶(0.5U/μl) 0.25 μl。反应条件:95℃预变性 15 min,94℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,终末 72℃延伸 5 min。

1.2.4 DNA 测序 使用测序试剂盒 (Big Dye

Terminator ABI Prism sequencing kit, Applied Biosystems)对纯化的基因片段进行测序。测序反应产物经纯化后,使用 ABI Prism 3130XL 型自动荧光测序仪(Applied Biosystems)电泳测序。使用序列分析软件 (DNA Sequencing Analysis Software v5.1, Applied Biosystems) 分析测序结果并用 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)将所测序列与 GenBank 中的已知序列(登录号:NM_002052)进行比对以识别基因变异。如果发现基因突变,则联合检索我国的万方数据库(<http://www.wanfangdata.com.cn>)、美国的人类单核苷酸多态数据库(

.nih.gov/SNP) 和人类基因突变数据库 (<http://www.hgmd.org>), 以明确所发现的基因突变是否已有报道。

1.2.5 多序列对比分析 使用在线多序列对比分析软件 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 对比分析各物种 GATA4 蛋白序列中突变氨基酸在进化上的保守性。各物种 GATA4 蛋白序列来源于蛋白质数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), 其序列号分别为: 人 (NP_002043.2), 黑猩猩 (XP_528070.2), 猴 (XP_001087008.2), 狗 (NP_001041577.1), 牛 (NP_001179806.1), 小鼠 (NP_032118.2), 大鼠 (NP_653331.1), 禽 (XP_420041.1), 蛙 (NP_001016949.1), 斑马鱼 (NP_571311.1), 果蝇 (NP_732098.1)。

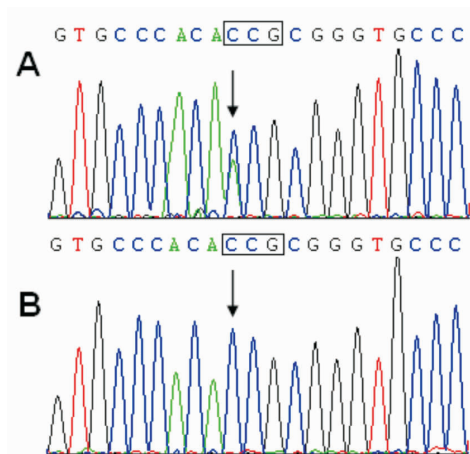
2 结果

2.1 识别出 3 个新的 GATA4 基因突变

通过对 110 例无血缘关系的先天性心脏病患者的 GATA4 基因进行测序筛查, 在其中 3 例患者各识别出 1 个杂合错义突变, 突变率约为 2.73%。1 例房间隔缺损患者 GATA4 基因编码序列第 124 位的胞嘧啶 (cytosine, C) 变为腺嘌呤 (adenine, A), 即 c.124C>A 突变, 导致第 42 位的脯氨酸 (proline, P) 变为苏氨酸 (threonine, T), 亦即 p.P42T 突变; 1 例室间隔缺损患者 GATA4 基因编码序列第 142 位的鸟嘌呤 (guanine, G) 变为 A, 即 c.142G>A 突变, 导致第 48 位的缬氨酸 (valine, V) 变为甲硫氨酸 (methionine, M), 亦即 p.V48M 突变; 另 1 例室间隔缺损患者 GATA4 基因编码序列第 257 位的 G 变为胸腺嘧啶 (thymine, T), 即 c.257G>T 突变, 导致第 191 位的丝氨酸 (serine, S) 变为异亮氨酸 (isoleucine, I), 即 p.S191I 突变。这些突变均不存在于 100 名无血缘关系的正常对照者中。经检索这些突变不存在于人类单核苷酸多态数据库和基因突变数据库中。c.124C>A、c.142G>A 和 c.257G>T 突变序列及其对照序列分别见图 1~3。

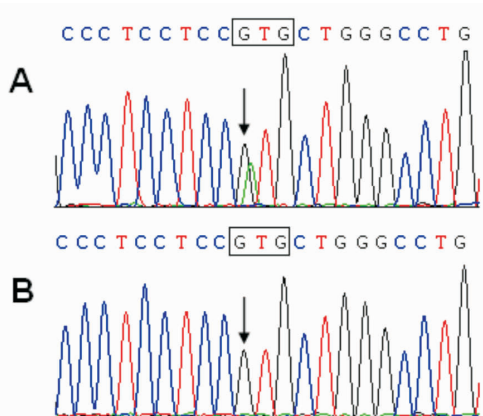
2.2 GATA4 突变氨基酸在进化上具有保守性

多序列比对分析显示, 突变氨基酸在哺乳动物 GATA4 进化上高度保守, 提示这些氨基酸对 GATA4 蛋白具有重要的功能作用。各物种 GATA4 蛋白序列的比对结果见图 4。



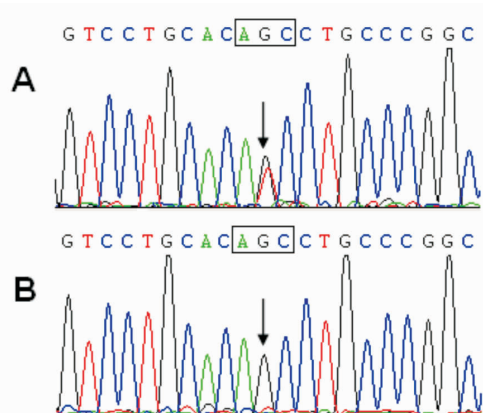
注: 图 1-A 为房间隔缺损患者 GATA4 基因 c.124C>A 突变的杂合子 C/A 序列, 图 1-B 为正常对照者 GATA4 基因纯合子 C/C 序列, 箭头所示为突变点及其对照序列。

图 1 GATA4 基因 c.124C>A 突变及其对照序列



注: 图 2-A 为室间隔缺损患者 GATA4 基因 c.142G>A 突变的杂合子 G/A 序列, 图 2-B 为正常对照者 GATA4 基因纯合子 G/G 序列, 箭头所示为突变点及其对照序列。

图 2 GATA4 基因 c.142G>A 突变及其对照序列



注: 图 3-A 为 1 例室间隔缺损患者 GATA4 基因 c.257G>T 突变的杂合子 G/T 序列, 图 3-B 为正常对照者 GATA4 基因纯合子 G/G 序列, 箭头所示为突变点及其对照序列。

图 3 GATA4 基因 c.257G>T 突变及其对照序列

| | 29 | P42T | V48M | | 62 | 180 | S191I | | 200 | |
|-----|------------------|------|-------|---|-----------------|-----|-------------|---|------------|-----|
| 人 | ---GAGAASSPVYVPT | P | RVPSS | V | LGLSYLQGGGAGSA | --- | SAGPFDSPVLH | S | LPGRANPAA | --- |
| 猩猩 | ---GAGAASSPVYVPT | P | RVPFF | V | LGLSYLQGGGAGSA | --- | SAGPFDSPVLH | F | LPGRANPAA | --- |
| 猴 | ---GAGAASSPVYVPT | P | RVPSS | V | LGLSYLQGGGAGSA | --- | SAGPFDSPVLH | S | LPGRANPAA | --- |
| 狗 | ---GAGAASSPVYVPT | P | RVPSS | V | LGLSYLQGGGGAAA | --- | SAGPFDSPVLH | S | LPGRANPAA | --- |
| 牛 | ---GAGAASSPVYVPT | P | RVPSS | V | LGLSYLQGGGGGAA | --- | SAGPFDSPVLH | S | LPGRANPAA | --- |
| 小鼠 | ---SAGAASSPVYVPT | P | RVPSS | V | LGLSYLQGGGSAAA | --- | SAGPFDSPVLH | S | LPGRANPG | --- |
| 大鼠 | ---SAGAASSPVYVPT | P | RVPSS | V | LGLSYLQGGGSGAA | --- | SAGPFDSPVLH | S | LPGRANPA | --- |
| 禽 | ---GAAAAS-PVYVPT | T | RVPSM | L | PSLPYLPSSGSSQQ | --- | TSSPFDSPMLH | N | LQSRGTPAA | --- |
| 蛙 | ---SATAATSPVYVPT | T | RVSSM | I | PSLPYLQTS GSSQQ | --- | TASPFDSMMLH | N | LQNRAGPAA | --- |
| 斑马鱼 | ---N---STSPVYVTP | T | RGTPM | I | QALPYLQAP---QQ | --- | TASHFDSSVLH | S | LQPERGRCL | --- |
| 果蝇 | ---LTSATORDSLSPE | N | DAYFA | A | AQLGSSLONSSVYA | --- | AAAAADGTTGR | V | DPGITFLSAS | --- |

图 4 多物种 GATA4 蛋白氨基酸序列比对

3 讨论

先天性心脏病是心脏和大血管发育异常所致的一种常见疾病,遗传因素在先天性心脏病的发生上具有重要作用,遗传度高达 0.6~0.7,至少 2% 的先天性心脏病是由单基因异常所致^[10]。本研究通过对先天性心脏病患者的 GATA4 基因进行序列分析,发现了 3 个新的杂合错义突变,即 P42T、V48M 和 S191I 突变。这些突变不存在于正常对照者,而且突变氨基酸在哺乳动物进化上高度保守,因此 GATA4 基因突变很可能是这些先天性心脏病患者的分子病因。

人类 GATA4 基因定位于染色体 8p23.1-p22,其 mRNA 由 1 个非编码外显子和 6 个编码外显子组成,编码 442 个氨基酸,所形成的蛋白即锌指转录因子在进化上高度保守,由 N 端的转录激活结构域(1~208)、中部两个毗邻的锌指结构域(216~266、270~321)和 C 端构成。锌指结构域(Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys)可与靶基因启动子的 DNA 序列元件 5'-(AT)GATA(AG)-3' 特异性结合,调节下游靶基因的转录活性。其中心脏特异性表达的靶基因主要有肌凝蛋白重链基因、肌凝蛋白轻链基因、肌钙蛋白基因、血管紧张素 II 1 型受体基因、心房利钠肽基因以及钠/钙交换器、M2 型胆碱受体、A1 型腺苷受体基因等。因此,GATA4 在心脏发育过程中可能起着重要的调控作用^[11]。本研究发现的 3 个基因突变均位于转录激活结构域,很有可能直接抑制 GATA4 转录因子的转录活性,下调靶基因的表达,从而导致心脏发育障碍。

GATA4 基因对心脏的正常发育具有重要的调节作用。小鼠 GATA4 基因在整个胚胎发育过程中均大量表达,而且终生持续高水平表达^[12]。表达功能缺失性突变型 GATA4 基因的转基因小鼠心脏发育缺陷,可见间隔缺损、右室发育不全、心内膜垫缺失、法洛四联症、右室双流出道和心肌病等,常在胚胎发育的第 8~9 d 死亡^[13]。GATA4 基因敲除纯合子小鼠则因原始心管不能形成而胎死腹中^[14]。此外,GATA4 基因也是果蝇、鱼、鸡和蟾蜍等动物心脏正常发育所必须的^[11]。这些研究结果表明 GATA4 基因在动物心脏发育方面发挥着重要作用,GATA4 基因异常可导致动物心脏发育缺陷甚至死亡。

人类 GATA4 基因突变可导致多种类型的先天性心脏病,如房间隔缺损、室间隔缺损、房室间隔缺损、右室双流出道、肺动脉缩窄、左心室发育不良、心内膜垫缺失、右心室发育不全、动脉导管未闭等^[15]。这些突变绝大多数使心脏同源盒转录因子的结合能力降低或转录活性下降,对靶基因的转录激活作用减弱,从而引发先天性心脏病。这些人类 GATA4 基因突变相关心脏表型与 GATA4 基因工程小鼠模型的心脏异常类似,提示 GATA4 基因在人类心脏发育过程中也有重要的调控作用,GATA4 基因杂合突变可能导致单倍型效率不足,引发先天性心脏病。

综上所述,本研究扩大了先天性心脏病相关 GATA4 基因的突变谱,揭示了先天性心脏病新的分子病因,有助于先天性心脏病的早期预防、危险分层和基因特异性治疗。

参考文献

[1] Szili-Torok T, Kornyei L, Jordaens LJ. Transcatheter ablation of

- arrhythmias associated with congenital heart disease[J]. J Interv Card Electrophysiol, 2008, 22(2): 161-166.
- [2] Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [3] Khairy P, Aboulhosn J, Gurm MZ, et al. Arrhythmia burden in adults with surgically repaired tetralogy of Fallot: a multi-institutional study[J]. Circulation, 2010, 122(9): 868-875.
- [4] Briggs LE, Takeda M, Cuadra AE, et al. Perinatal loss of Nkx2-5 results in rapid conduction and contraction defects[J]. Circ Res, 2008, 103(6): 580-590.
- [5] Chan JY, Takeda M, Briggs LE, et al. Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase[J]. Circ Res, 2008, 102(5): 571-580.
- [6] Garg V, Kathiriyi IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5[J]. Nature, 2003, 424(6947): 443-447.
- [7] Nemer G, Fadlalah F, Usta J, et al. A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot[J]. Hum Mutat, 2006, 27(3): 293-294.
- [8] Salazar M, Consoli F, Villegas V, et al. Search of somatic GATA4 and NKX2.5 gene mutations in sporadic septal heart defects[J]. Eur J Med Genet, 2011, 54(3): 306-309.
- [9] Liu XY, Wang J, Zheng JH, et al. Involvement of a novel GATA4 mutation in atrial septal defects[J]. Int J Mol Med, 2011, 28(1): 17-23.
- [10] Gelb BD. Genetic basis of congenital heart disease[J]. Curr Opin Cardiol, 2004, 19(2): 110-115.
- [11] Pikkariainen S, Tokola H, Kerkelä R, et al. GATA transcription factors in the developing and adult heart[J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(2): 196-207.
- [12] Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development[J]. Dev Biol, 1994, 164(2): 361-733.
- [13] Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, et al. GATA 4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation[J]. Genes Dev, 1997, 11(8): 1048-1060.
- [14] Molkentin J, Lin Q, Duncan SA, et al. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis[J]. Gene Dev, 1997, 11(8): 1061-1072.
- [15] Matsuoka R. GATA4 mutation and congenital cardiovascular diseases: importance of phenotype and genetic background clarification[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(6): 667-669.

(收稿:2011-10-25 修回:2011-12-01)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 40 页)

- [9] Pittman JR, Koenig A, Brainard BM. The effect of unfractionated heparin on thrombelastographic analysis in healthy dogs[J]. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2010, 20(2): 216-223.
- [10] Moallempour M, Jahr JS, Lim JC, et al. Methemoglobin effects on coagulation: a dose-response study with HBOC-200 (Oxyglobin) in a thrombelastogram model[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 23(1): 41-47.
- [11] Johansson PI. Goal-directed hemostatic resuscitation for massively bleeding patients: the Copenhagen concept[J]. Transfus Apher Sci, 2010, 43(3): 401-405.
- [12] Spiezia L, Marchioro P, Radu C, et al. Whole blood coagulation assessment using rotation thrombelastogram thromboelastometry in patients with acute deep vein thrombosis[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2008, 19(5): 355-360.
- [13] Hobson AR, Petley G, Morton G, et al. Point-of-care platelet function assays demonstrate reduced responsiveness to clopidogrel, but not aspirin, in patients with drug-eluting stent thrombosis whilst on dual antiplatelet therapy[J]. Thromb J, 2008, 6: 1.
- [14] Tsukui H, Abela A, Teuteberg JJ, et al. Cerebrovascular accidents in patients with a ventricular assist device[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 134(1): 114-123.
- [15] Haizinger B, Gombotz H, Rehak P, et al. Activated thrombelastogram in neonates and infants with complex congenital heart disease in comparison with healthy children[J]. Br J Anaesth, 2006, 97(4): 545-552.
- [16] Fuchs RJ, Levin J, Tadel M, et al. Perioperative coagulation management in a patient with afibrinogenemia undergoing liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2007, 13(5): 752-756.
- [17] Ruttman TG, Lemmens HJ, Malott KA, et al. The haemodilution enhanced onset of coagulation as measured by the thrombelastogram is transient[J]. Eur J Anaesthesiol, 2006, 23(7): 574-579.

(收稿:2011-06-02 修回:2011-11-28)

(本文编辑:金谷英)