

特发性扩张型心肌病相关 LRRC10 基因新突变的识别

张献玲 张 戟 郭惠欣 刘宝鑫 刘小军 彭文辉 魏毅东 徐亚伟

【摘要】 目的:识别特发性扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)相关 LRRC10 基因新突变。 方法:收集 120 例特发性 DCM 患者和 200 名健康对照者的血标本,用基因组纯化试剂盒提取基因组 DNA。通过聚合酶链式反应扩增 LRRC10 基因的编码外显子及其两侧的内含子,在 DNA 测序仪上对扩增片段进行测序。将所测序列与核苷酸数据库中的 LRRC10 基因序列进行比对,寻找可能的基因突变。借助在线程序 MUSCLE 分析突变氨基酸的保守性,应用 MutationTaster 和 PolyPhen-2 预测突变的致病性。 结果:在 1 例特发性 DCM 患者中发现了 1 种新的 LRRC10 基因杂合错义突变,即 p. R157G 突变,突变率约为 0.83%。在 200 名健康对照者无此基因突变。多物种 LRRC10 蛋白的氨基酸序列对比显示,第 157 位的精氨酸在进化上完全保守,致病性预测表明这种突变具有致病性。 结论:本研究发现特发性 DCM 相关 LRRC10 基因新突变,揭示了特发性 DCM 新的分子病因。

【关键词】 扩张型心肌病;遗传学;基因;LRRC10;突变

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.02.013

Identification of a novel LRRC10 mutation associated with idiopathic dilated cardiomyopathy ZHANG Xianling, ZHANG Ji, GUO Huixin, LIU Baoxin, LIU Xiaojun, PENG Wenhui, WEI Yidong, XU Yawei. Department of Cardiology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

【Abstract】 **Objective:** To identify novel LRRC10 mutation associated with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods:** Blood samples from 120 patients with idiopathic DCM and 200 healthy individuals were collected, and the genomic DNA was extracted with DNA extraction kit. The coding exons and their flanking introns of the LRRC10 gene were amplified by polymerase chain reaction and the amplicons were sequenced with DNA sequencing kit under DNA Analyzer. The obtained sequences were aligned with those of LRRC10 from Nucleotide database to identify potential sequence variations. Online program MUSCL was used to analyze whether altered amino acid was conserved evolutionarily. Both Mutation Taster and PolyPhen-2 were used to predict the pathogenic potentiality of the identified mutation. **Results:** A novel heterozygous LRRC10 mutation, p. R157G, was identified in an idiopathic DCM patient, with a mutational prevalence of 0.83%. This mutation was absent in the 200 control individuals. Alignment of LRRC10 proteins among multiple species showed that the altered amino acid was completely conserved evolutionarily. The mutation was predicted to be causative.

Conclusion: This study reveals a novel LRRC10 mutation associated with idiopathic DCM, indicating novel molecular etiology responsible for idiopathic DCM.

【Key words】 Dilated cardiomyopathy; Genetics; Gene; LRRC10; Mutation

基金项目:国家自然科学基金(81400180)

作者单位:200072 上海,同济大学附属第十人民医院心内科

通信作者:徐亚伟,Email: xuyawei69@163.com

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是最常见的心肌病,是慢性充血性心力衰竭、心脏移植和心源性猝死的重要原因^[1]。研究表明,遗传缺陷是特发性 DCM 发生的重要原因,目前已经发现了 50 多个基因与特发性 DCM 有关^[2]。尽管如此,由于 DCM 具有显著的遗传异质性,大部分 DCM 患者的致病基因仍有待识别。近年来的研究发现,LRRC10 基因特异地大量表达于胎儿和成人心脏,对心脏正常发育和行使功能具有关键作用^[3-5]。LRRC10 基因敲除小鼠在出生前就发生心功能异常,出生后很快发生 DCM^[6]。因此,有必要将 LRRC10 基因作为特发性 DCM 的重要候选基因进行研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

将 120 例无亲缘关系的中国汉族特发性 DCM 患者设为研究组,其中男 56 例,女 64 例,年龄 43~65 岁,平均年龄 54 岁。对照组为 200 名无血缘关系的汉族健康人,其中男 90 名,女 110 名,年龄

42~68 岁,平均年龄 55 岁。全部研究对象均经详细询问病史、体格检查以及心脏超声和心电图检查,必要时进行冠脉造影检查。特发性 DCM 的诊断依据世界卫生组织制定的标准:在无心脏负荷异常、冠心病、先天性心脏病和其他全身性疾病的条件下,校正的左室舒张末期内径 $>27\text{ mm/m}^2$ 及左室射血分数 $<40\%$,或左室短轴缩短率 $<25\%$ ^[7]。

1.2 方法

1.2.1 抽提基因组 DNA 经研究对象知情同意后抽取外周静脉血 2 mL,使用基因组 DNA 抽提试剂盒(Promega)抽提基因组 DNA。

1.2.2 设计并合成扩增 LRRC10 基因的引物 从核苷酸数据库中获取 LRRC10 基因的基因组 DNA 序列(登陆号:NC_000012),借助 Primer 3.0 在线程序设计 2 对引物扩增 LRRC10 基因的 1 个编码外显子及其两侧的内含子,由 DNA 合成仪(Applied Biosystem)化学合成。所设计引物的核苷酸序列见表 1。

表 1 扩增 LRRC10 基因整个编码区及其剪接位点的引物序列

外显子	正向引物(5'至 3')	反向引物(5'至 3')	扩增片段(碱基对)
1-a	TAGGATAGGCCCCAGAGCAG	GGAGACTCAGCTCACAGACC	520
1-b	GCACCTTGAAACAGCTCTGC	AGAACATGCTGCAGTTGGGT	600

1.2.3 扩增 LRRC10 基因 以研究对象的基因组 DNA 为模板,分别使用上述 2 对引物以及 HotStar Taq DNA 聚合酶等聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)试剂(Qiagen),在 PE9700 型 PCR 仪(Applied Biosystem)上扩增 LRRC10 基因片段。使用 QIAquick 凝胶回收纯化试剂盒(Qiagen)对扩增产物进行纯化。

1.2.4 LRRC10 基因测序分析 以纯化的 PCR 产物为模板,使用 1 条上述引物和 Big Dye Terminator v3.1 测序试剂(Applied Biosystem)在 PCR 仪上进行测序反应。纯化测序 PCR 产物,在 ABI PRISM 3130 XL 型 DNA 测序仪(Applied Biosystem)上进行电泳测序,并将所测序列与核苷酸数据库中的已知 LRRC10 序列进行对比分析,寻找 LRRC10 基因变异。将发现的基因变异在万方数据库(<http://www.wanfangdata.com.cn>)以及 PubMed 和 SNP 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中检索,以核实其是否为新的变异。

1.2.5 对比分析多物种 LRRC10 蛋白的氨基酸序

列 使用在线软件 MUSCLE(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),分析多物种 LRRC10 蛋白的氨基酸序列,评估被改变氨基酸的保守性。

1.2.6 预测 LRRC10 基因变异的致病性 分别使用在线程序 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>)和 PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>),对所识别的 LRRC10 基因变异的致病性进行分析,并显示相应的参数。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 12.0 软件包进行统计分析。两组数值变量的比较使用非配对 Student's *t* 检验;两组分类变量的比较使用 Pearson's χ^2 检验。以双侧统计量值 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 特发性 DCM 患者的临床特点

本研究的两组对象均无 DCM 的传统危险因素如高血压病、冠心病、先天性心脏病等;DCM 患者均有心脏扩大和充血性心力衰竭;健康对照者的心脏结构与功能均正常。两组的性别构成和年龄均

无显著性差异，基础临床特点见表 2。

表 2 特发性 DCM 患者和健康对照者的基础临床特点

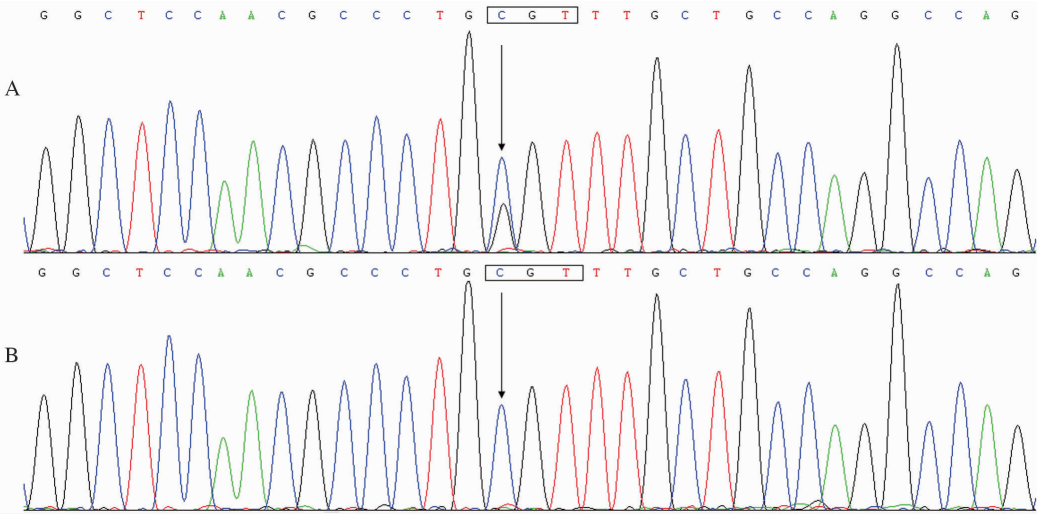
临床特点	DCM 患者 (n = 120)	对照者 (n = 200)	P 值
年龄/岁	54 ± 9	55 ± 8	0.3
男性/例(%)	56(47)	90(45)	0.82
DCM 家族史/例(%)	32(27)	0(0)	<0.01
收缩压/mmHg	113 ± 12	121 ± 10	<0.01
舒张压/mmHg	79 ± 8	88 ± 7	<0.01
心率/次 · min ⁻¹	89 ± 12	75 ± 8	<0.01
左室舒张末期内径/mm	65 ± 7	46 ± 5	<0.01
左室收缩末期内径/mm	57 ± 8	35 ± 5	<0.0001
左室射血分数/%	38 ± 8	62 ± 7	<0.0001

2.2 发现 LRRC10 基因新突变

通过测序分析，在 1 例特发性 DCM 患者中发现了 LRRC10 杂合错义突变，突变率约为 0.83%。该例家族史阴性的 55 岁女性特发性 DCM 患者，LRRC10 基因之编码核苷酸序列第 469 位的胞嘧啶 (cytosine, C) 被鸟嘌呤 (guanine, G) 所取代，即 c.469C>G 突变，导致 LRRC10 基因编码氨基酸序列第 157 位的精氨酸 (arginine, R) 变为甘氨酸 (glycine, G)，即 p. R157G 突变。LRRC10 基因 c.469C>G 杂合突变及其正常对照序列见图 1。

2.3 受影响的氨基酸在进化上完全保守

将人的 LRRC10 蛋白之氨基酸序列与猩猩、猴子、狗、牛、小鼠、大鼠、鸡、斑马鱼和蛙的进行比对显示，第 157 位的精氨酸在进化上完全保守，提示该氨基酸对 LRRC10 发挥正常功能具有重要作用(见图 2)。



注：箭头所指分别为 LRRC10 基因 c.469C>G 突变型杂合子 C/G 和野生型纯合子 C/C 序列

图 1 LRRC10 基因 c.1087C>G 突变及其对照序列

	142	R157G	172
NP_963844.2 (人)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	LLPGQLRRRLQELRTI---
XP_522465.1 (猩猩)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	LLPGQLRRRLQELRTI---
XP_001117377.1 (猴)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	LLPGQLRRRLQELRTI---
XP_005625671.1 (狗)	---ELAVLRTLHAGSNGL	R	GLPGQLRLRLRELRTI---
NP_001069225.1 (牛)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	LLPGQLRLRLRELRTI---
NP_666354.1 (小鼠)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	LLPGQLRRRLRELRTI---
NP_001101566.1 (大鼠)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	LLPGQLRRRLRELRTI---
XP_004937622.1 (禽)	---ELSLLKTLHAGSNAL	R	TLPTRLRGLCELRSI---
NP_001009559.1 (斑马鱼)	---ELPNIKTLHLGYNQL	R	SLPAELGRLEELRSI---
XP_002938552.2 (蛙)	---ELTLKTLHAGSNFI	R	QLPNELNQLNKETRST---

图 2 多物种 LRRC10 蛋白氨基酸序列比对结果

2.4 所发现的 LRRC10 基因 c.469C>G 变异是致病突变

通过 MutationTaster 预测分析，该 LRRC10 基因变异 c.469C>G 具有致病性，这一预测结果正确的概率值为 0.998。另外，使用 PolyPhen-2 也预测该 LRRC10 基因变异 p. R157G 可能是致病性突变，预测结果正确的概率是 0.59，这一预测的敏感性是 0.87，特异性是 0.91。

3 讨论

本研究在 1 例特发性 DCM 患者中发现了新的 LRRC10 基因杂合错义突变，即 p. R157G 突变。该

突变不存在于 200 名健康对照者的基因组中,跨物种 LRRC10 蛋白的氨基酸序列比对显示,受影响的氨基酸在进化上完全保守,计算机功能模拟分析显示该基因变异是致病突变。因此,本研究所发现的 LRRC10 基因突变很可能是该例特发性 DCM 患者的分子病因。然而,该基因突变的致病机制仍有待于进一步深入研究。

人类 LRRC10 基因位于染色体 12q15 区域,编码一种由 227 个氨基酸组成的蛋白。LRRC10 基因自胚胎早期至成年均大量表达于心脏,广泛分布于心肌细胞的细胞质和细胞核,与 Z 盘、肌浆网和横管等的标志物共定位,并可与横管发生相互作用^[5]。心肌横管蛋白包括 α 肌动蛋白和其辅助蛋白,目前已经发现 α 肌动蛋白及其他多种肌小节蛋白突变可导致 DCM^[8]。因此,LRRC10 基因突变很可能通过干扰 Z 盘肌小节蛋白间的相互作用或其与细胞骨架蛋白间的相互作用而导致 DCM。

尽管 LRRC10 基因异常与人类特发性 DCM 的关系尚无报道,但是一些动物实验结果已经显示 LRRC10 基因缺陷可导致 DCM。斑马鱼的 LRRC10 基因沉默可导致心肌细胞数量减少,心输出量和心室射血分数下降^[9]。小鼠 LRRC10 基因敲除可导致其在宫腔内即发生心脏收缩功能下降,在出生后不久就出现心室扩大,表现为典型的 DCM^[6]。这些动物实验研究结果表明,LRRC10 基因是心脏得以正常发育并具有正常功能所必需的。

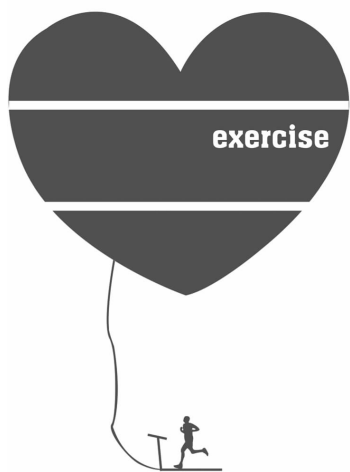
总之,本研究首次报道 LRRC10 基因突变可能导致人类特发性 DCM,这不仅揭示了 DCM 新的分子病因,也有助于研发新的 DCM 防治药物。

参 考 文 献

- [1] Li RG, Li L, Qiu XB, et al. GATA4 loss-of-function mutation underlies familial dilated cardiomyopathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(4): 591-596.
- [2] Li J, Liu WD, Yang ZL, et al. Prevalence and spectrum of GATA4 mutations associated with sporadic dilated cardiomyopathy[J]. Gene, 2014, 548(2): 174-181.
- [3] Nakane T, Satoh T, Inada Y, et al. Molecular cloning and expression of HRLRRP, a novel heart-restricted leucine-rich repeat protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(4): 1086-1092.
- [4] Adameyko II, Mudry RE, Houston-Cummings NR, et al. Expression and regulation of mouse SERDIN1, a highly conserved cardiac-specific leucine-rich repeat protein[J]. Dev Dyn, 2005, 233(2): 540-552.
- [5] Kim KH, Kim TG, Micales BK, et al. Dynamic expression patterns of leucine-rich repeat containing protein 10 in the heart[J]. Dev Dyn, 2007, 236(8): 2225-2234.
- [6] Brody MJ, Hacker TA, Patel JR, et al. Ablation of the cardiac-specific gene leucine-rich repeat containing 10 (Lrrc10) results in dilated cardiomyopathy[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51621.
- [7] Elliott P, O' Mahony C, Syrris P, et al. Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3(4): 314-322.
- [8] McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy[J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 19-26.
- [9] Kim KH, Antkiewicz DS, Yan L, et al. Lrrc10 is required for early heart development and function in zebrafish[J]. Dev Biol, 2007, 308(2): 494-506.

(收稿:2014-11-18 修回:2015-01-20)

(本文编辑:丁媛媛)



运动演绎精彩

健康成就未来