

先天性心脏病相关 PITX2c 基因新突变研究

潘 云 周 宁 赵 红 郑桂芬 刘兴元

【摘要】 目的:研究先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)相关 PITX2c 基因的新突变。方法:收集 150 例 CHD 患者和 200 名正常对照者的外周静脉血标本,使用 DNA 纯化试剂盒分离基因组 DNA。使用 DNA 聚合酶扩增 PITX2c 基因的编码区和剪接位点,应用 DNA 测序试剂盒在 DNA 分析仪上对扩增片段进行测序。将所测序列与 GenBank 数据库中的 PITX2c 基因序列进行比对以发现 PITX2c 基因突变。使用在线程序 MUSCLE 分析突变氨基酸的保守性,分别应用 MutationTaster 和 PolyPhen-2 分析突变氨基酸的致病性。结果:在 1 例散发性 CHD 患者发现了 1 个新的 PITX2c 基因杂合错义突变,即 p. S101G 突变,突变率约为 0.67%。该错义突变不存在于 200 名正常对照者。跨物种 PITX2c 蛋白之氨基酸序列对比显示第 101 位的丝氨酸在进化上完全保守,致病性预测显示所发现的 PITX2c 基因变异是致病性突变。结论:本研究揭示了 CHD 相关 PITX2c 基因新突变,对于制定新的 CHD 防治策略具有潜在的意义。

【关键词】 先天性心脏病;室间隔缺损;遗传学;转录因子;PITX2c

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.03.016

Study of a novel PITX2c mutation associated with congenital heart disease PAN Yun, ZHOU Ning, ZHAO Hong, ZHENG Guifen, LIU Xingyuan. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200065, China

【Abstract】 Objective: To study a novel PITX2c mutation associated with congenital heart disease (CHD). **Methods:** Clinical data and peripheral venous blood specimens from 150 patients with CHD and 200 healthy individuals used as controls were collected. The genomic DNA was isolated with DNA extraction kit. The coding regions and splicing sites of the PITX2c gene were amplified by using DNA polymerase. The amplified products were sequenced with DNA sequencing kit under DNA Analyzer. The obtained sequences were aligned with those of PITX2c from GenBank to identify a novel PITX2c variation. The online program MUSCLE was used to analyze whether the altered amino acid was conserved evolutionarily. MutationTaster and PolyPhen-2 were used to predict the disease-causing likeliness, respectively. **Results:** A novel heterozygous PITX2c mutation, p. S101G, was identified in a patient with sporadic CHD, with a mutational prevalence of about 0.67%. The missense mutation was absent in the 200 control subjects. Multiple alignments of PITX2c proteins across species exhibited that the altered amino acid was completely conserved evolutionarily. The identified PITX2c variation was predicted to be a pathogenic mutation. **Conclusion:** This study reveals a novel PITX2c mutation associated with CHD, suggesting potential implications in the development of new prophylactic and therapeutic strategies for CHD.

【Key words】 Congenital heart disease; Ventricular septal defect; Genetics; Transcriptional factor; PITX2c

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)

是婴幼儿非感染性死亡的最常见病因^[1]。根据解剖结构差异,CHD 在临床上可以分为 20 种以上不同的类型,其中以室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)最为常见^[1]。严重的 CHD 可以降低患者的生

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@163.com

活质量和运动耐力,导致神经系统损伤、肺动脉高压、充血性心力衰竭、心律失常甚至心源性猝死等^[1-3]。遗传因素是 CHD 发生的重要原因,现已经发现了 50 多个 CHD 相关基因^[4-6]。尽管如此,这些 CHD 相关基因也只能解释小部分患者的病因,大部分患者的遗传基础依然不明。研究发现,心脏转录因子基因 PITX2c 对心脏的正常发育具有关键作用^[7]。在小鼠,PITX2c 基因敲除可导致胚胎期死亡,主要是由各种心血管发育缺陷所致,包括心房畸形、房间隔缺损、VSD、右心室双流出道、大动脉转位和主动脉弓异常^[8]。因此,PITX2c 基因可以作为 CHD 的重要候选基因。

1 对象与方法

1.1 研究对象

150 例无血缘关系的中国汉族 CHD 患儿为 CHD 组,男 82 例,女 68 例,年龄 0~3 岁,平均 1 岁。200 名无血缘关系的种族匹配的健康幼儿为对照组,男 120 名,女 80 名,年龄 0~3 岁,平均 1 岁。详细询问病史、全面体检以及经胸心脏超声和 12 导联标准心电图检查,排除综合征型 CHD 患者。经患儿父母知情同意后抽取外周静脉血 1~2 mL,于抗凝管中混匀后 -20℃ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 分离基因组 DNA 使用购买的基因组 DNA 纯化试剂盒(美国 Promega 公司),遵照操作说明书从研究对象的白细胞中提取基因组 DNA。

1.2.2 扩增 PITX2c 基因 使用文献报道的 6 对引物^[9],以研究对象的基因组 DNA 为模板,应用 HotStar Taq DNA 聚合酶等聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂(德国 Qiagen 公司),在 PE9700 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司)上扩增 PITX2c 基因片段。使用凝胶回收试剂盒(中国生工生物工程公司)纯化扩增的目的 DNA 片段。

1.2.3 PITX2c 基因突变扫描 以纯化的目的 DNA 片段为模板,在 PCR 仪上进行测序反应。利用 3130 XL 型 DNA 分析仪(美国 Applied Biosystem 公司)对每一纯化的 PCR 产物进行电泳测序,并将所测序列与 GenBank 中的已知 PITX2c 序列(登陆号:NM_000325.5)进行对比,以发现可能的 PITX2c 基因突变。对于所发现的 PITX2c 基因突变,检索我国的万方数据库(<http://www.wanfangdata.com.cn>),以及美国的 PubMed 和

SNP 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),以明确其是否为新发现突变。

1.2.4 分析突变位点氨基酸在进化上的保守性 使用 3.6 版本的在线软件 MUSCLE(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),比较多物种 PITX2c 蛋白的氨基酸序列,以明确突变位点氨基酸在进化上的保守性。

1.2.5 预测 PITX2c 基因突变的致病性 使用在线程序 MutationTaster(<http://www.mutationtaster.org>)和 PolyPhen-2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>),对所检测出的 PITX2c 基因变异的致病性进行预测分析,并给出相应的预测分析量值。

1.3 统计学分析

用均数 ± 标准差表示连续变量。使用非配对 Student's *t* 检验对两组连续变量进行比较,而两组分类变量的比较则使用 Pearson's χ^2 检验。以双侧 $P < 0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 发现新的 PITX2c 基因杂合错义突变

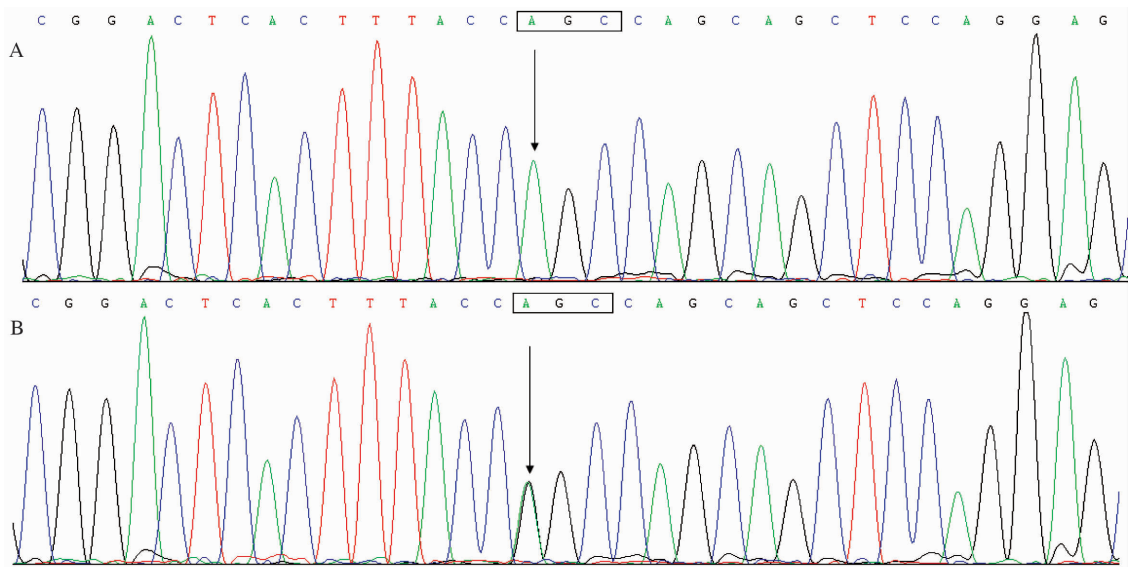
通过基因测序分析,在 1 例 CHD 患儿中发现了 1 个 PITX2c 杂合错义突变,突变率约为 0.67%。该例半岁男婴为散发性 VSD 患儿,其 PITX2c 基因第 101 密码子的第一个核苷酸腺嘌呤(adenine, A)被鸟嘌呤(guanine, G)所替换,即 c.301A>G 突变,意味着其 PITX2c 基因编码氨基酸序列第 101 位的丝氨酸(serine, S)变成了甘氨酸(glycine, G),即 p.S101G 突变。经检索,该 PITX2c 突变此前尚无报道,提示为新发现的突变。PITX2c 基因 c.301A>G 杂合突变及其正常对照 DNA 序列见图 1。

2.2 被改变的氨基酸在进化上完全保守

将人 PITX2c 蛋白之氨基酸序列与猩猩、猴、犬、牛、小鼠、大鼠、禽、斑马鱼、果蝇、蚊子和蟾蜍的进行比对显示,第 101 位的丝氨酸在进化上完全保守,提示该氨基酸对 PITX2c 的功能具有重要作用(见图 2)。

2.3 此 PITX2c 基因变异为致病性突变

MutationTaste 预测分析表明,本研究所发现的 PITX2c 基因变异 c.301A>G 是一个致病性突变,这一预测结果正确的概率值高达 99.9%。在 MutationTaster 数据库中,没有发现 PITX2c 基因之 c.301A>G 变异,进一步证实该 PITX2c 基因变异是新突变。此外, PolyPhen-2 也预测 PITX2c 基因变异 p.S101G 具有致病性,其预测正确的概率为 99.6%,这一预测的敏感性是 36%,特异性是 97%。



注:箭头所指分别为 PITX2c 基因野生型纯合子 A/A 和 c. 301A>G 突变型杂合子 A/G 序列

图 1 PITX2c 基因 c. 301A>G 杂合突变及其正常对照序列

	84	S101G	118
NP_000316.2 (人)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
XP_001141234.1 (猩猩)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
XP_001091288.1 (猴)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
XP_851370.1 (犬)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
NP_001091460.1 (牛)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
NP_001035967.1 (小鼠)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
NP_001035970.1 (大鼠)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
NP_990341.1 (禽)	--- EDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
NP_571050.1 (斑马鱼)	--- DDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---
NP_733410.2 (果蝇)	--- KNDKKNKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEHTFSRNRYPD ---
XP_310944.5 (蚊子)	--- KNDKKNKRQRRQRTHTFT	S	QQLHELEQTFSRNRYPD ---
NP_001017227.1 (蟾蜍)	--- DDPSKKKRQRRQRTHTFT	S	QQLQELEATFQNRNYPD ---

图 2 多物种 PITX2c 蛋白的氨基酸序列比对结果

3 讨论

PITX2 是成对样同源盒转录因子家族中的一员, 目前已经发现有 4 种不同的转录本, 分别为 PITX2a、PITX2b、PITX2c 和 PITX2d, 其中前 3 种仅是氨基端不同, 存在于人、鼠、禽、斑马鱼和蛙, 而第 4 种则缺少整个氨基端连同大部分同源盒结构域, 仅存在于人

类^[10]。人类 PITX2c 基因定位于染色体 4q25, 编码含 324 个氨基酸所组成的蛋白^[11]。PITX2c 蛋白主要表达于胚胎期和成年心脏, 是心血管正常发育所必须的^[12]。在小鼠, PITX2c 蛋白特异性地表达于小梁和间隔心肌, 尤其是与房室通道和流出道的心内膜垫有关的心肌, 对心脏间隔形成起着关键作用^[13]。

PITX2c 基因敲除小鼠可因各种心血管发育畸形而死亡,主要有心房畸形、房间隔缺损、VSD、右心室双流出道、大动脉转位和主动脉弓异常^[8]。利用化学修饰的反义寡核苷酸敲除蟾蜍 PITX2c 基因可导致心脏发育障碍,其中最常见的畸形是流出道异常,可发生于 23% 的注射过 PITX2c 基因反义寡核苷酸的蟾蜍胚胎。PITX2c 基因靶向 RNA 干扰所导致的其他心脏畸形包括房间隔异常、心室发育抑制和房室腔相对位置异常等^[14]。这些动物实验研究结果表明,发育中的心血管系统对 PITX2c 基因的表达水平极其敏感,PITX2c 基因功能异常可导致 CHD。

本研究在 1 例散发性 VSD 患儿检测出了 1 个新的 PITX2c 基因杂合错义突变,即 p. S101G 突变。该突变在 200 名无 CHD 的对照者基因组中没有发现。跨物种 PITX2c 蛋白的氨基酸序列比对显示,人 PITX2c 蛋白第 101 位的丝氨酸在进化上完全保守,计算机功能模拟分析表明所发现的 PITX2c 基因变异是致病性突变。因此,PITX2c 基因缺陷很有可能导致该例患者发生 VSD。

PITX2c 基因变异与人类 CHD 的关系以前也有报道。Yuan 等^[15]对 150 例无血缘关系的 CHD 患者的 PITX2c 基因的编码外显子及其两侧的部分内含子进行了测序分析,结果在其中 2 例散发性房间隔缺损患者分别发现了 p. H98Q 和 p. M119T 突变,突变率约为 1.33%。报告基因分析显示,这两种突变型 PITX2c 基因的转录活性均显著降低。Wang 等^[16]对 382 例无血缘关系的 CHD 患者的 PITX2c 基因进行了测序分析,结果在其中 1 例家族史阴性的右室双流出道合并 VSD 患者发现 p. W147X 突变;在另 1 例家族史阳性的 VSD 患者发现 p. N153D 突变,突变率约为 0.52%。生化分析显示,这两种突变型 PITX2c 对靶基因的转录激活作用显著下降。另外,Wei 等^[17]对 170 例无血缘关系的 CHD 患儿的 PITX2c 基因的整个编码区和剪接位点进行了测序分析,结果在其中 2 例大动脉转位合并 VSD 患儿分别发现了 p. R91Q 和 p. T129S 突变,突变率约为 1.18%。功能研究表明,这两种突变均显著降低 PITX2c 对靶基因的转录激活作用。这些研究发现提示,PITX2c 基因功能缺失性突变可能是导致部分 CHD 的分子机制。

本研究发现了 CHD 相关新的 PITX2c 基因突变,扩大了 CHD 相关 PITX2c 基因的突变谱,有助于制定新的 CHD 防治策略。

参 考 文 献

- [1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics—2014 update; a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2014, 129(3): e28-e292.
- [2] Sommer RJ, Hijazi ZM, Rhodes JF Jr. Pathophysiology of congenital heart disease in the adult; part I: Shunt lesions[J]. *Circulation*, 2008, 117(8): 1090-1099.
- [3] Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, et al. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease; a scientific statement from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(21): 2183-2242.
- [4] 毛红柳, 刘兴元. 先天性心脏病相关 GATA5 基因突变研究[J]. *国际心血管病杂志*, 2013, 40(3): 173-177.
- [5] 徐 蕾, 袁 方, 李若谷, 等. 先天性房间隔缺损相关 GATA6 基因新突变的识别[J]. *国际心血管病杂志*, 2014, 41(2): 121-124.
- [6] Andersen TA, Troelsen Kde L, Larsen LA. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(8): 1327-1352.
- [7] Clauss S, Käbb S. Is Pitx2 growing up? [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(2): 105-107.
- [8] Liu C, Liu W, Palie J, et al. Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions [J]. *Development*, 2002, 129(21): 5081-5091.
- [9] Yang YQ, Xu YJ, Li RG, et al. Prevalence and spectrum of PITX2c mutations associated with familial atrial fibrillation [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(3): 2873-2876.
- [10] Simard A, Di Giorgio L, Amen M, et al. The Pitx2c N-terminal domain is a critical interaction domain required for asymmetric morphogenesis[J]. *Dev Dyn*, 2009, 238(10): 2459-2470.
- [11] Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, et al. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome [J]. *Nat Genet*, 1996, 14(4): 392-399.
- [12] Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, et al. PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(2): 123-133.
- [13] Furtado MB, Biben C, Shiratori H, et al. Characterization of Pitx2c expression in the mouse heart using a reporter transgene[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(1): 195-203.
- [14] Dagle JM, Sabel JL, Littig JL, et al. Pitx2c attenuation results in cardiac defects and abnormalities of intestinal orientation in developing *Xenopus laevis*[J]. *Dev Biol*, 2003, 262(2): 268-281.
- [15] Yuan F, Zhao L, Wang J, et al. PITX2c loss-of-function mutations responsible for congenital atrial septal defects[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(10): 1422-1429.
- [16] Wang J, Xin YF, Xu WJ, et al. Prevalence and spectrum of PITX2c mutations associated with congenital heart disease [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32(12): 708-716.
- [17] Wei D, Gong XH, Qiu G, et al. Novel PITX2c loss-of-function mutations associated with complex congenital heart disease[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(5): 1201-1208.

(收稿:2014-12-15 修回:2015-01-20)

(本文编辑:丁媛媛)