

缺氧诱导因子 1- α 基因 C1744T 多态与先天性心脏病的相关性研究

倪世宏 刘兴元 魏 东 杨奕清

【摘要】 目的:研究缺氧诱导因子 1- α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF1 α)基因 C1744T 多态与先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)的关系。 方法:入选 CHD 患儿 110 例(病例组)及无 CHD 儿童 200 名(对照组),收集其临床资料和血标本,使用基因组 DNA 纯化试剂盒抽提基因组 DNA。通过聚合酶链反应扩增 HIF1 α 基因的第 12 个外显子,应用 DNA 测序试剂盒在 DNA 测序仪上对扩增片段进行测序。统计分析 HIF1 α 基因 C1744T 多态在病例组和对照组间的频率分布。 结果:HIF1 α 基因编码核苷酸序列第 1744 位的等位基因 C、T 及其构成的 3 种基因型 CC、CT、TT 在 CHD 在病例组和对照组间的频率分布存在显著性差异,病例组等位基因 T 及基因型 CT 和 TT 的频率较低(等位基因频率经 Fisher 精确检验比较, $P=0.0179$;基因型频率经 Fisher 精确检验比较, $P=0.0139$)。 结论:HIF1 α 基因 C1744T 多态与 CHD 的易感性有关,等位基因 T 降低 CHD 的发生率。

【关键词】 先天性心脏病;遗传学;基因多态性;缺氧诱导因子

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.01.014

Study on the association of the polymorphism of C1744T in the hypoxia-inducible factor 1-alpha gene with congenital heart disease NI Shihong¹, LIU Xingyuan², WEI Dong³, YANG Yiqing⁴. 1. Department of Pediatrics, Baoshan Branch of Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200431, China; 2. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China; 3. Department of Pediatrics, Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China; 4. Department of Cardiovascular Research Laboratory, Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

【Abstract】 Objective: To study the association of the polymorphism C1744T in the hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 α) gene with congenital heart disease (CHD). **Methods:** A total of 110 children with CHD (case group) and 200 children without CHD (control group) were recruited. The clinical data and blood samples from all the study participants were collected. The genomic DNA was extracted with DNA purification kit. The twelfth coding exon of the HIF1 α gene was amplified by polymerase chain reaction. The amplicons were sequenced with DNA sequencing kit under a DNA Analyzer. The frequency distributions of the polymorphism C1744T in HIF1 α were statistically analyzed between the case and control groups. **Results:** Between the case and control groups, there was significant difference in the frequency distributions of the alleles C and T at coding nucleotide 1 744 of HIF1 α , as well as the genotypes of CC, CT and TT, with lower frequencies of allele T and genotypes CT and TT observed in the case group (for the comparison of allelic frequency by Fisher's exact test, $P=0.0179$; for the comparison of genotypic frequency by Fisher's exact test, $P=0.0139$).

Conclusion: The polymorphism of C1744T in HIF1 α is associated with the susceptibility to CHD, with allele T contributing to a decreased prevalence of CHD.

【Key words】 Congenital heart disease; Genetics; Gene polymorphism; Hypoxia-inducible factor

基金项目:上海市宝山区自然科学基金(12-E-25)

作者单位:200431 上海,复旦大学附属华山医院宝山分院儿科(倪世宏);200065 上海,同济大学医学院附属同济医院儿科(刘兴元);200040 上海,上海交通大学附属儿童医院儿科(魏 东);200030 上海,上海交通大学附属胸科医院心血管研究室(杨奕清)

通信作者:倪世宏,Email: ni_shihong@sina.com

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是人类最常见的发育异常, 可导致运动耐力降低、神经系统发育障碍、血栓栓塞、肺动脉高压、心力衰竭、心律失常和心源性猝死, 而且是婴幼儿最常见非感染性死因^[1-2]。越来越多的证据显示, 遗传缺陷是 CHD 发生的重要原因, 而且已经发现了许多基因变异与 CHD 有关^[3-6]。近年来的研究发现, 缺氧诱导因子 1- α (hypoxia-inducible factor 1- α , HIF1 α) 基因对心脏的正常发育、结构重构和功能具有重要作用^[7]。在鼠, HIF1 α 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, 包括原始血管融合、环化障碍以及心肌特化、分化异常和心室畸形等^[8]。目前已经发现 HIF1 α 基因多态与人类多种疾病有关, 包括缺血性心脏病、肿瘤、糖尿病等^[9-12]。由于位于 HIF1 α 基因第 12 个外显子的 C1744T 多态 (也被称为 c. 1744C>T, p. P582S, C1772T 或 rs11549465 多态) 已被证实对 HIF1 α 的功能具有显著地增强作用^[12], 因此, 本研究首先明确 HIF1 α 基因 C1744T 多态与 CHD 的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

随机选取 110 例无血缘关系的中国汉族 CHD 患儿为病例组, 其中男 62 例, 女 48 例, 年龄 0~5 岁, 平均 2 岁; 200 名无血缘关系的中国汉族无 CHD 儿童为对照组, 男 115 例, 女 85 例, 年龄 0~5 岁, 平均 2 岁。详细询问病史、全面体检以及心脏彩色多普勒超声检查。全部 CHD 患儿均经心脏超声或心脏手术确诊, 排除综合征型 CHD 患者。经儿童父母知情同意后收集其血常规检验后原本丢弃的剩余血, 使用基因组 DNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司), 按照操作说明提取全部研究对象的基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 扩增 HIF1 α 基因第 12 外显子的引物设计

登录美国的生物信息中心网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 进入核苷酸数据库 (登录号 NG_029606) 下载 HIF1 α 基因的基因组 DNA 序列, 使用在线软件 (<http://primer3.ut.ee/>) 设计一对扩增 HIF1 α 基因第 12 外显子的引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。其中正向引物序列是 5'-GAAGT-GACTTTGAGTTTCACTTGT-3', 反向引物序列是 5'-CTCAAGAAATTGCGTTAGGGCAT-3', 所扩增

片段的大小为 639 bp。

1.2.2 HIF1 α 基因第 12 外显子的扩增

以基因组 DNA 为模板, 使用上述引物和 Hot-Star Taq DNA 聚合酶 (德国 Qiagen 公司) 等聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂, 在 PE9700 型热循环仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 上扩增 HIF1 α 基因第 12 外显子。PCR 反应的总体积为 25 μ L, 包括 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, 5 \times Q 溶液 5 μ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 基因组 DNA (200 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L, HotStar Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L 和双蒸水 13.25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 此后进入 35 个循环, 每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应结束后使用凝胶回收试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 纯化所扩增的 DNA 片段。

1.2.3 HIF1 α 基因第 12 外显子多态扫描

使用上述正向引物、纯化的 DNA 片段和 DNA 测序试剂盒 (美国 Applied Biosystem 公司) 在 PE9700 型热循环仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 上进行测序反应。测序反应的总体积为 10 μ L, 包括预混合液 4 μ L, 纯化的 DNA (20 ng/ μ L) 2 μ L, 上游引物 (2 μ mol/L) 1 μ L 和双蒸水 3 μ L。测序反应的条件是: 总计 30 个循环, 每个循环 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。测序反应产物经纯化后在 3130 XL 型 DNA 测序仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 上进行测序。使用 DNA 序列分析软件 (美国 Applied Biosystem 公司) 分析测序结果并将所测序列与核苷酸数据库中的已知 HIF1 α 基因序列 (登录号 NG_029606) 进行对比以识别 HIF1 α 基因多态。

1.3 统计学分析

使用 SPSS16.0 统计软件包对数据进行统计学分析。连续变量用均数 \pm 标准差表示。两组连续变量的比较使用非配对 Student's *t* 检验, 两组分类变量的比较根据需要使用 Pearson's χ^2 检验或 Fisher 精确概率计算。双侧统计值 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CHD 患儿的临床特点

对照组与病例组儿童的年龄和性别匹配, 均无明确的 CHD 相关环境危险因素, 如母亲在怀孕头 3

个月患病或服用药物、父母吸烟以及长期接触毒物或射线等。110 例 CHD 患儿的基本临床特点见表 1。

表 1 110 例 CHD 患儿的基本临床特点

临床变量	统计值
年龄/岁	2.4±1.1
男性/例(%)	62(56.4)
阳性 CHD 家族史/例(%)	8(7.3)
不同临床类型 CHD 的分布/例(%)	
单纯型 CHD	69(62.7)
VSD	30(27.3)
ASD	25(22.7)
PDA	9(8.2)
其他单纯型 CHD	5(4.5)
复合型 CHD	41(37.3)
TOF	22(20.0)
ASD+VSD	8(7.3)
ASD+PDA	6(5.5)
其他复合型 CHD	5(4.5)
心律失常发生率	7(6.4)
临床处理/例(%)	
手术治疗	38(34.5)
经导管介入治疗	29(26.4)
随访	43(39.1)

注:CHD, 先天性心脏病; VSD, 室间隔缺损; ASD, 房间隔缺损; PDA, 动脉导管未闭; TOF, 法洛四联症。

2.2 HIF1α 基因 C1772T 多态的发现

通过对研究对象进行 PCR 测序发现,在 CHD 患儿和健康儿童均存在 HIF1α 基因 C1744T 多态。显示 HIF1α 基因编码外显子序列第 1744 位的纯合等位基因 C、纯合等位基因 T 以及杂合等位基因 C/T 的代表性测序结果见图 1。

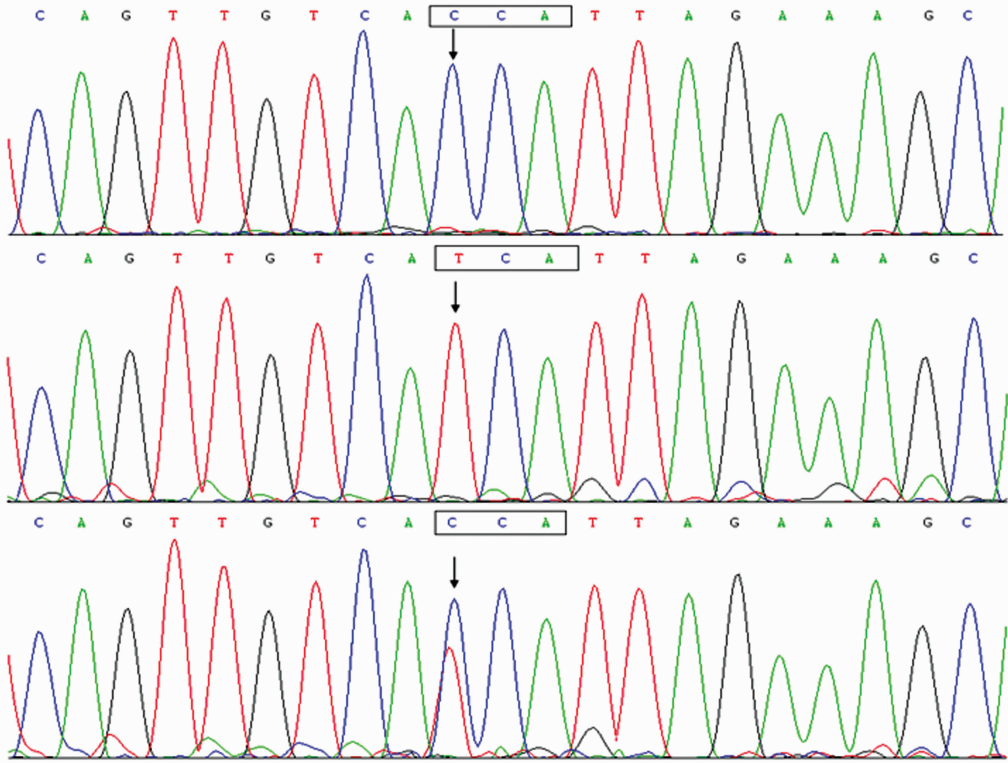
2.3 HIF1α 基因 C1744T 多态在 2 组中的频率差异

在 HIF1α 基因编码核苷酸序列第 1744 位的等位基因 C、T 及其构成的 3 种基因型 CC、CT、TT 在 CHD 在病例组和对照组间的频率分布存在显著性差异,病例组等位基因 T 及基因型 CT 和 TT 的频率较低(见表 2)。两组等位基因频率经 Fisher 精确检验比较, $P=0.0179$;两组基因型频率经 Fisher 精确检验比较, $P=0.0139$ 。

表 2 CHD 患儿和无 CHD 对照者的基因型和等位基因频率分布

组别	基因型频率			等位基因频率	
	CC	CT	TT	C	T
病例组($n=110$)	105	5	0	215	5
对照组($n=200$)	173	26	1	372	28

注:两组基因型频率比较, $P=0.0179$;等位基因频率比较, $P=0.0139$



注:箭头所指为纯合等位基因 C、纯合等位基因 T 以及杂合等位基因 C/T

图 1 HIF1α 基因 c.1744C>T 多态序列图

3 讨论

本研究发现, HIF1 α 基因 C1744T 多态在病例组和对照组中的频率分布存在显著性差异, 等位基因 T 及其构成的基因型 CT 和 TT 在病例组显著低于对照组, 提示等位基因 T 具有降低人类 CHD 易感性的保护性作用, HIF1 α 基因 C1744T 多态可能是人类进化选择的有益结果。

人类 HIF1 α 基因定位于 14q21-24, 有 15 个外显子, 编码一种由 826 个氨基酸所组成的 HIF1 的 α 亚单位, 与 β 亚单位一起以异二聚体的形式构成功能性 HIF1^[7]。HIF1 是一种核转录因子, 其中 α 亚单位既是调节亚单位又是活性亚单位, 其蛋白稳定性和转录活性均受细胞内氧浓度的调节; 而 β 亚单位为多种转录因子所共有, 可在细胞核中持续表达, 且不受氧浓度影响, 其功能可能与维持 HIF1 α 二聚体结构的稳定性及活性构象有关^[13]。HIF1 α 是目前所识别的唯一一个高度特异性的、在低氧条件下能够发挥活性的转录因子, 对氧浓度十分敏感, 是专一调节氧稳态的重要蛋白, 也被称为“缺氧基因表达的总开关”^[13]。HIF1 α 作为转录因子与低氧反应元件结合, 可以诱导 100 多个重要下游靶基因的表达, 包括血管内皮生长因子基因、促红细胞生成素基因、血红素加氧酶 1 基因等, 并通过调控这些靶基因而在心血管胚胎发育、红细胞生成、细胞生长等方面发挥重要的生理作用^[9, 13-14]。因此, HIF1 α 基因对心血管的正常发育尤其是在低氧等恶劣环境下的正常发育具有不可替代的关键调控作用。

在人类, 目前已经发现多种疾病相关 HIF1 α 基因多态, 其中研究得最多的是 rs11549465 (即 c. 1744C>T, p. P582S 或 C1772T 多态) 和 rs11549467 (即 c. 1762G>A, p. A588T 或 G1790A 多态) 多态, 这两种多态均显著增强 HIF1 α 对靶基因的转录激活作用, 而且 rs11549465 多态的功能增强性作用更强^[15-17]。既往的研究表明, HIF1 α 基因的这些功能多态与肿瘤、糖尿病、缺血性心脏病和腰椎间盘突出性变等多种疾病有关^[9-12]。本研究发现, HIF1 α 基因 c. 1744C>T 多态与 CHD 有关, 等位基因 T 降低 CHD 的易感性, 提示 HIF1 α 的功能增强对心血管的正常发育具有重要的保护作用。

总之, 本研究发现人类 HIF1 α 基因 c. 1744C>T 多态与 CHD 的易感性降低有关, 这为制定 CHD 防治策略提供了新的分子靶标。

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] Kahr PC, Diller GP. Almanac 2014: congenital heart disease[J]. *Heart*, 2015, 101(1): 65-71.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, et al. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty[J]. *Circ Res*, 2013, 112(4): 707-720.
- [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] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76: 39-56.
- [8] Compennolle V, Brusselmans K, Franco D, et al. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 60(3): 569-579.
- [9] Ye Y, Wang M, Hu S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α C1772T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis including 18,334 subjects[J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(4): 126-135.
- [10] Nagy G, Kovacs-Nagy R, Kereszturi E, et al. Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample[J]. *BMC Med Genet*, 2009, 10: 79.
- [11] Resar JR, Roguin A, Voner J, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha polymorphism and coronary collaterals in patients with ischemic heart disease[J]. *Chest*, 2005, 128(2): 787-791.
- [12] Lin WP, Wang XJ, Wang CR, et al. Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1alpha gene may confer susceptibility to LDD in Chinese cohort [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73158.
- [13] 祁 琳, 张晓雷, 毛立群, 等. HIF-1 与低氧性疾病关系的研究进展[J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2013, 22(4): 330-333.
- [14] 李海生, 朱玲玲, 范 明. 低氧诱导因子-1 结构、活性调节及其靶基因的研究进展[J]. *军事医学科学院院刊*, 2004, 28(2): 183-186.
- [15] Hu X, Fang Y, Zheng J, et al. The association between HIF-1 α polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2): 903-916.
- [16] Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(11): 1779-1783.
- [17] Fu XS, Choi E, Bubley GJ, et al. Identification of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation[J]. *Prostate*, 2005, 63(3): 215-221.

(收稿: 2015-07-25 修回: 2015-09-28)

(本文编辑: 丁媛媛)