

先天性心脏病相关 HAND1 基因新突变研究

倪世宏 魏 东 刘兴元 李艳杰 杨潇潇 杨奕清

【摘要】 目的:研究先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)相关 HAND1 基因新突变。 方法:入选 CHD 患儿 136 例及健康对照儿童 200 名,抽提基因组 DNA,通过聚合酶链反应测序筛查 HAND1 基因突变。应用计算机软件评估突变氨基酸的保守性并预测突变的致病性,应用双荧光素酶报告基因分析系统分析突变对 HAND1 功能的影响。 结果:在 1 例法洛四联征患儿发现 1 种新的 HAND1 基因杂合突变,其编码核苷酸序列第 389 位的胸腺嘧啶突变为鸟嘌呤(c. 389T>G),相应氨基酸序列的第 130 位亮氨酸变为精氨酸(p. L130R)。该突变改变了进化上保守的氨基酸序列并被预测为有致病性,功能研究揭示突变型 HAND1 的转录激活功能显著降低。 结论:该 HAND1 基因功能缺失性新突变可能是 CHD 的少见分子病因。

【关键词】 先天性心脏病;遗传学;转录因子;HAND1;报告基因分析

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.01.009

Study of a novel mutation in the HAND1 gene associated with congenital heart disease NI Shihong¹, WEI Dong², LIU Xingyuan³, LI Yanjie⁴, YANG Xiaoxiao⁴, YANG Yiqing⁴. 1. Department of Pediatrics, Baoshan Branch of Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200431; 2. Department of Pediatrics, Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040; 3. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065; 4. Department of Cardiology and Cardiovascular Research Laboratory, Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

【Abstract】 Objective: To study a novel mutation in the HAND1 gene associated with congenital heart disease (CHD). **Methods:** A cohort of 136 children with CHD and a total of 200 healthy children as controls were recruited and their genomic DNAs were extracted. By direct polymerase chain reaction-sequencing, the HAND1 gene was screened for a novel mutation. The computer software was used to evaluate the conversation of the altered amino acid and to predict the pathogenic potential of the identified mutation. The dual-luciferase reporter assays were performed to explore the effect of the mutation on HAND1 function. **Results:** A novel heterozygous mutation, a substitution of guanine for thymine at the nucleotide position 389 (c. 389T>G), predicting the conversion of leucine into arginine at amino acid 130 (p. L130R), was detected in a child with Fallot's tetralogy. The mutation altered the amino acid conserved evolutionarily, and was predicted to be causative. Functional studies revealed that the mutant HAND1 was associated with significantly decreased transcriptional activity. **Conclusion:** The novel loss-of-function mutation of HAND1 identified in the present study is likely to be an uncommon molecular etiology responsible for CHD.

【Key words】 Congenital heart disease; Genetics; Transcription factor; HAND1; Reporter gene assay

基金项目:上海市宝山区自然科学基金(12-E-25);上海市自然科学基金(16ZR1432500);国家自然科学基金(81270161)

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);200040 上海交通大学附属儿童医院儿科(魏 东);200065 上海,同济大学医学院附属同济医院儿科(刘兴元);200030 上海交通大学附属胸科医院心内科,心血管研究室(李艳杰,杨潇潇,杨奕清)

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是人类最常见的出生缺陷, 约占全部主要出生缺陷的 1/3, 全球每年有 130 余万 CHD 患儿出生^[1]。严重的 CHD 可导致脑发育延迟、肺动脉高压、心力衰竭、心律失常和心源性猝死, 是婴幼儿非感染性死亡的最常见原因^[2]。研究表明, 遗传缺陷是 CHD 的重要病因, 而且已经发现了 60 多个 CHD 相关基因^[3-5]。近年来的研究显示, HAND1 基因对心血管的正常发育具有关键作用^[6]。在小鼠, HAND1 基因大量表达于胎心, 敲除 HAND1 基因可导致小鼠胚胎早期死亡, 主要是由于心血管发育严重缺陷如心脏环化、心腔间隔化和心室肌分化障碍等所致^[7]。心肌特异性 HAND1 基因敲除小鼠可表现为多种类型的 CHD, 包括室间隔缺损、主动脉骑跨、房室瓣发育不良和右心室双流出道^[8]。因此, HAND1 遗传缺陷也可能导致人类 CHD。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 136 例无血缘关系的中国汉族 CHD 患儿为病例组 (男 69 例, 年龄 0~4 岁, 平均 2 岁) 和 200 名无血缘关系的种族、性别和年龄匹配的健康儿童为对照组 (男 102 例, 年龄 0~4 岁, 平均 2 岁)。全部研究对象均进行全面体检以及心脏彩色多普勒超声检查。全部患儿均经心脏超声或心脏手术确诊 CHD, 而对照组儿童正常。经儿童父母知情同意后收集其血常规检验后的剩余血标本, 采用基因组 DNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司) 纯化基因组 DNA。

1.2 研究方法

1.2.1 HAND1 基因突变筛查 以全部研究对象的基因组 DNA 为模板, 使用根据文献^[9]设计合成的引物和 HotStar Taq DNA 聚合酶 (德国 Qiagen 公司) 等试剂, 在 Veriti 型热循环仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 上扩增 HAND1 基因的全部编码外显子。单个 PCR 的总体积为 25 μ L, 其中 5Q 溶液 5 μ L, 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 基因组 DNA (100 ng/ μ L) 2 μ L, HotStar Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 双蒸水 12.25 μ L。PCR 的条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 随后进入 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 5 min。使用

上述上下游引物、纯化的 PCR 产物和 BigDye[®] Terminator v3.1 测序试剂盒在 Veriti 型热循环仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 上进行测序 PCR 反应。单个测序 PCR 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, 上游或下游引物 (2 μ mol/L) 1 μ L 和双蒸水 3 μ L。测序 PCR 的条件: 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。纯化测序 PCR 产物并用 3130 XL 型 DNA 测序仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 进行电泳测序。使用 DNA 序列分析软件 (美国 Applied Biosystem 公司) 分析测序结果并与核苷酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>) 中的已知 HAND1 基因序列 (登陆号 NC_000005) 进行对比以识别 HAND1 基因变异。如发现 HAND1 基因变异, 则对 200 名健康对照儿童的 HAND1 基因进行测序分析, 同时检索数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed> 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 以评估所发现基因变异的新颖性。

1.2.2 HAND1 基因变异的保守性分析 应用多序列比对软件 MUSCLE (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/cmd=Retrieve&dopt=AlignmentScores&list_uids=3545), 对比分析多种 HAND1 蛋白的氨基酸序列以明确被改变氨基酸在进化上的保守性。

1.2.3 HAND1 变异的致病性预测 应用在线软件 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>)、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)、SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) 和 PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) 预测所识别的 HAND1 基因变异的致病性。

1.2.4 表达质粒构建及定位诱变 真核表达质粒 HAND1-pcDNA3.1 的构建如文献^[9]所述。使用 1 对以突变点为中心、长 31 个核苷酸残基的互补的引物和 QuickChange II XL 定向诱变试剂盒 (美国 Stratagene 公司) 通过定位诱变 PCR 将所识别的突变导入野生型 HAND1-pcDNA3.1 质粒, 经测序证实。表达萤火虫萤光素酶的 ANF-luc 报告基因质粒由日本千叶大学医学院的 Ichiro Shiojima 博士惠赠。使用表达海肾萤光素酶的 pGL4.75 质粒 (美国 Promega 公司) 作为内对照以校正转染效率。

1.2.5 HAND1 的双荧光素酶报告基因分析 使用添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 HeLa 细胞。铺 12 孔板 24 h 后使用 Lipofectamine® 2000 试剂(美国 Invitrogen 公司)进行细胞转染。在每次细胞转染试验中,分别单独使用 1.0 μg 对照空质粒 pcDNA3.1、1.0 μg 野生型 HAND2-pcDNA3.1、1.0 μg 突变型 HAND2-pcDNA3.1 或各 0.5 μg 的野生型及突变型 HAND2-pcDNA3.1,同时使用 1.0 μg ANF-luc 和 0.04 μg pGL4.75。转染 48 h 后裂解细胞,使用双荧光素酶报告基因分析系统(美国 Promega 公司),依照使用说明书依次检测萤火虫和海肾萤光素酶的活性。以萤火虫萤光素酶活性相对于海肾萤光素酶活性的倍数表示 ANF 启动子的活性。每种细胞转染实验做 3 次,取平均值。

1.3 统计学分析

借助 SPSS 16.0 软件包对数据进行统计分析。连续变量用均数 ± 标准差表示,分类变量用百分数表示。两组连续变量的比较使用非配对 Student's *t* 检验,分类变量的比较使用 Pearson's 卡方检验。以双侧 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CHD 患儿的基线临床特点

病例组与对照组均为汉族,性别和年龄匹配。全部研究对象均无明确的 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、吸烟以及接触毒物等。136 例 CHD 患儿的基线临床特点见表 1。

2.2 HAND1 基因新突变

测序分析 HAND1 基因,在 1 例家族史阴性的 1 岁男性法洛四联征患儿发现 1 种新的杂合错义突变,其编码核苷酸序列第 389 位的胸腺嘧啶突变成鸟嘌呤(c.389T>G),相应氨基酸序列的第 130 位亮氨酸变成了精氨酸(p.L130R)。此外,对突变携带者的父母进行 HAND1 基因序列分析未发现突变,表明该突变为新发生的突变。该突变不存在于 200 名对照儿童,在 PubMed 和 SNP 数据库中也未见报道,表明是一个新发现的突变。杂合性 HAND1 突变 c.389T>G 及其对照 DNA 测序结果见图 1。

2.3 被改变氨基酸的保守性分析

多物种 HAND1 蛋白序列比对分析显示被改变氨基酸即第 130 位的亮氨酸在物种进化上完全保守,见图 2。

表 1 136 例 CHD 患儿的基线临床特点

临床参数	n(%)
男性	69(50.7)
阳性 CHD 家族史	11(8.1)
不同临床类型 CHD 的分布	
单纯型 CHD	75(55.1)
室间隔缺损	32(23.5)
房间隔缺损	20(14.7)
动脉导管未闭	8(5.9)
右心室双流出道	5(3.7)
主动脉干永存	4(2.9)
其他单纯型 CHD	6(4.4)
复合型 CHD	61(44.9)
法洛四联征	34(25.0)
室间隔缺损 + 房间隔缺损	9(6.6)
房间隔缺损 + 动脉导管未闭	5(3.7)
右心室双流出道 + 室间隔缺损	5(3.7)
大动脉转位 + 室间隔缺损	2(1.5)
其他复合型 CHD	6(4.4)
心律失常	8(5.9)
临床处理	
手术治疗	59(43.4)
经导管介入治疗	37(27.2)
随访	40(29.4)

2.4 HAND1 序列变异的致病性

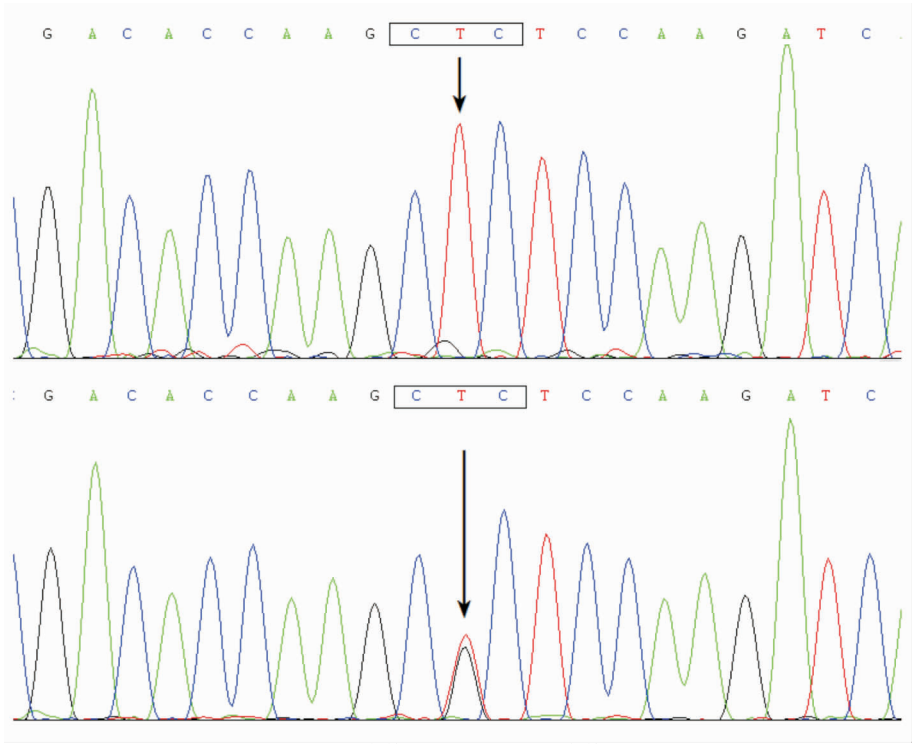
HAND1 基因 c.389T>G 变异或其编码蛋白 p.L130R 变异经 MutationTaster、PolyPhen-2、SIFT 和 PROVEAN 程序均预测有致病性,其中 MutationTaster 的预测值为 1.00, PolyPhen-2 的预测值为 1.00(敏感性为 0, 特异性为 1.00), SIFT 的预测值为 0, PROVEN 预测值为 -5.96。

2.5 突变对 HAND1 转录激活功能的影响

等量(1.0 μg)野生型和 L130R 突变型 HAND1 对靶基因 ANF 启动子的转录激活作用分别约为 9 倍和 2 倍(野生型与纯合突变型比较, *t* = 11.385, *P* = 0.0003);而等量(各 0.5 μg)野生型和 L130R 突变型 HAND1 一起对靶基因 ANF 启动子的转录激活作用约为 4 倍(野生型与杂合突变型比较, *t* = 7.397, *P* = 0.0018)。

3 讨论

本研究在 1 例法洛四联征患儿中发现 HAND1 新突变,该突变不存在于 200 名健康对照者,而且改



注:箭头所指为纯合等位基因 T/T 及杂合等位基因 T/G

图 1 HAND1 基因 c.389T>G 杂合突变及其正常对照序列图

	115	L130R	145
NP_004812.1 (Human)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
XP_518050.2 (Chimpanzee)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
XP_001111722.1 (Monkey)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
NP_001069229.1 (Cattle)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
NP_032239.1 (Mouse)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
NP_067603.1 (Rat)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
NP_990296.1 (Fowl)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIAY---
NP_609370.2 (Fruitfly)	---SYLREKI PNVPDTK	L	SKIKT LKLAILYINY---
NP_001016743.1 (Frog)	---AELRECI PNVPADTK	L	SKIKT LRLATSYIGY---

注:箭头所指为第 130 位的亮氨酸

图 2 多物种 HAND1 蛋白序列比对结果

变了进化上高度保守的氨基酸序列,经预测具有致病性。基因分析显示突变型 HAND1 的转录激活作用显著降低。因此,遗传缺陷的 HAND1 可显著增加患者对 CHD 的易感性。

人类 HAND1 基因定位于 5q33,编码一种由 215 个氨基酸所组成的转录因子。以前的研究发现,HAND1 可以直接转录激活 ANF 启动子^[10]。本研究发现,人类新突变显著降低 HAND1 对 ANF

启动子的转录激活作用,提示 HAND1 基因突变所导致的单倍型不足或显性抑制效应可能是 CHD 的病理机制之一。

已经报道人类 HAND1 基因突变与其他多种类型的 CHD 有关。Reamon-Buettner 等^[11]通过对 31 例无血缘关系的心脏发育不良患者的心脏组织的 HAND1 基因进行了测序分析,结果在其中 24 例发育不良患者的心室组织发现了 1 个相同的移码突

变 p. A126fsX12。报告基因分析表明该突变型 HAND1 丧失了转录激活功能。随后, Reamon-Buettner 等^[12]对 68 个以间隔缺损为主的畸形心脏的 HAND1 基因进行了测序分析, 结果发现了 32 个不同的非同义突变。功能研究表明部分突变型 HAND1 的转录激活功能丧失或显著减弱。Cheng 等^[13]对 498 例无血缘关系的非综合征型 CHD 患者的 HAND1 基因编码区进行了测序分析, 结果在 2 例室间隔缺损患者各发现 1 个新的错义突变, 即 p. G73S 和 p. K152N 突变。酵母双杂交分析显示这 2 个突变均显著增加 HAND1 的转录激活作用。本研究在 1 例法洛四联征患者中发现了 1 个 HAND1 功能缺失性新突变, 扩大了 HAND1 基因相关临床表型谱, 提示 HAND1 基因在人类心血管发育和 CHD 方面具有更加广泛的作用。

总之, 本研究首次报道 HAND1 基因功能缺失性突变与人类法洛四联征有关, 对 CHD 患者及其病家族成员的遗传咨询具有潜在的重要意义。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2016, 133(4): e38-360.
- [3] 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): 116-119.
- [4] 潘 云, 周 宁, 赵 红, 等. 先天性心脏病相关 PITX2c 基因新突变研究[J]. 国际心血管病杂志, 2015, 42(3): 194-197.

- [5] Lu CX, Gong HR, Liu XY, et al. A novel HAND2 loss-of-function mutation responsible for tetralogy of Fallot[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2): 445-451.
- [6] Thattaliyath BD, Livi CB, Steinhilper ME, et al. HAND1 and HAND2 are expressed in the adult-rodent heart and are modulated during cardiac hypertrophy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 297(4): 870-875.
- [7] Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, et al. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1[J]. Nat Genet, 1998, 18(3): 266-270.
- [8] McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, et al. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner[J]. Development, 2005, 132(1): 189-201.
- [9] Zhou YM, Dai XY, Qiu XB, et al. HAND1 loss-of-function mutation associated with familial dilated cardiomyopathy[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(7): 1161-1167.
- [10] Morin S, Pozzulo G, Robitaille L, et al. MEF2-dependent recruitment of the HAND1 transcription factor results in synergistic activation of target promoters[J]. J Biol Chem, 2005, 16(37): 32272-32278.
- [11] Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Inga A, et al. A loss-of-function mutation in the binding domain of HAND1 predicts hypoplasia of the human hearts[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(10): 1397-1405.
- [12] Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Traverso I, et al. A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(19): 3567-3578.
- [13] Cheng Z, Lib L, Li Z, et al. Two novel HAND1 mutations in Chinese patients with ventricular septal defect[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(7-8): 675-677.

(收稿: 2016-02-14 修回: 2016-10-22)

(本文编辑: 丁媛媛)

**To cure sometimes,
to relieve often,
to comfort always.**

—Edward Livingston Trudeau

有时, 去治愈,
常常, 去帮助,
总是, 去安慰。

—爱德华·利文斯顿·特鲁多

