

特发性扩张型心肌病相关 GATA6 基因新突变的识别

李文昭 徐迎佳 李若谷 曲新凯 杨奕清 仇兴标

【摘要】 目的:识别特发性扩张型心肌病(DCM)相关 GATA6 基因新突变。 方法:入选 132 例特发性 DCM 患者和 220 名健康对照者,收集其临床资料和外周静脉血,使用 DNA 纯化试剂盒抽提基因组 DNA,采用聚合酶链反应试剂扩增 GATA6 基因的整个编码区,应用循环测序试剂盒对扩增的 GATA6 基因片段进行测序,将所测序列与 Nucleotide 数据库中的 GATA6 基因序列进行对比分析以识别 GATA6 基因突变。应用 MUSCLE 和 MutationTaster 在线系统评估突变氨基酸进化上的保守性和突变的致病性。

结果:通过序列分析发现 1 例散发性 DCM 患者的 GATA6 基因新变异 c. 1165G>T, 相当于 p. E389X 突变,在 220 名健康对照者中没有检测出该无义突变。跨物种 GATA6 蛋白序列比对分析表明,被改变的氨基酸在物种进化上完全保守,致病性预测显示该 GATA6 基因突变具有致病性。 结论:发现散发性 DCM 相关 GATA6 基因新突变,扩大了 DCM 相关 GATA6 基因突变谱。

【关键词】 扩张型心肌病;分子遗传学;转录因子;GATA6;突变

doi:10. 3969/j. issn. 1673-6583. 2018. 05. 009

Identification of a novel GATA6 mutation associated with idiopathic dilated cardiomyopathy LI Wenzhao, XU Yingjia, LI Ruogu, QU Xinkai, YANG Yiqing, QIU Xingbiao. Department of Cardiology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

【Abstract】 Objective: To identify a novel GATA6 mutation associated with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods:** In the present study, 132 unrelated cases with idiopathic DCM and 220 unrelated healthy control individuals were recruited. The clinical data and the peripheral venous blood samples were collected. The genomic DNA was isolated with a DNA purification kit. The entire coding regions of the GATA6 gene were amplified by using polymerase chain reaction reagents and the amplified GATA6 fragments were sequenced with a cycle sequencing kit. The obtained sequences were aligned with those of GATA6 derived from the Nucleotide database to identify a GATA6 sequence variation. The online computer softwares of MUSCLE and MutationTaster were used to evaluate whether the mutated amino acid was conserved evolutionarily and whether the mutation was causative respectively. **Results:** A novel heterozygous GATA6 mutation c. 1165G>C, equivalent to p. E389X, was identified in a sporadic DCM patient. The nonsense mutation was absent in the 220 control subjects. The altered amino acid was highly conserved evolutionarily, and the mutation was predicted to be pathogenic. **Conclusions:** This study reported the association of a novel GATA6 mutation with sporadic DCM, expanding the mutational spectrum of GATA6 linked to DCM.

【Key words】 Dilated cardiomyopathy; Molecular genetics; Transcriptional factor; GATA6; Mutation

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是最常见的原发性心肌疾病,是心力衰竭和心源性猝死的主要原因,也是心脏移植的首要原因^[1-2]。尽管 DCM 可继发于冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)、病毒性心肌炎和心律失常等疾病^[3-5],但部分 DCM 病因不明,称为特发性 DCM,主要与遗传缺陷有关。目前已经发现了 50 多个 DCM 相关基因,其中大部分基因编码心肌肌节蛋白、细胞骨架蛋白和核膜蛋白^[1-2]。近期研究发现,心脏 GATA 族转录因子基因 GATA4、GATA5 和 GATA6 突变均可导致家族性 DCM^[6-9]。另外,GATA4 基因突变也可导致散发性 DCM^[10]。鉴于 GATA6 与 GATA4 的表达谱与功能特点相似^[11],本研究将评估散发性 DCM 患者的 GATA6 基因突变谱。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究纳入 132 例无血缘关系且家族史阴性的特发性 DCM 患者,其中男性 77 例,女性 55 例,年龄为 42~59 岁,平均年龄 51 岁。患者均为中国汉族人,经过详细询问病史、全面体格检查、常规实验室检查和经胸超声心动图检查后明确诊断为 DCM。特发性 DCM 的诊断是基于世界卫生组织制定的如下标准:在心脏负荷正常且无冠心病和先天性心脏病等疾病的条件下,左室舒张末期期内径 $>27\text{ mm/m}^2$ 及左室射血分数 $<40\%$ 或左室短轴缩短率 $<25\%$ ^[1]。入选 220 名无血缘关系且种族匹配的健康人作为对照,其中男性 128 例,女性 92 例,年龄为 41~59 岁,平均年龄 52 岁。经知情同意后抽取外周静脉血 2 mL,注入抗凝管中于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 GATA6 基因编码区的扩增 使用基因组 DNA 纯化试剂盒(美国 Promega 公司)自外周血白细胞中抽提基因组 DNA。用于扩增 GATA6 基因编码外显子及其侧翼部分内含子的引物序列如文献^[9]。以基因组 DNA 为模板,使用 Taq DNA 聚合酶(德国 Qiagen 公司)等 PCR 试剂和 GATA6 基因特异性扩增引物在 Veriti 型热 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)上扩增 GATA6 基因片段。PCR 反应混合物的总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,包括双蒸水 $12.25\text{ }\mu\text{L}$, $5\times\text{Q}$ 溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$,dNTP(各 2.5 mmol/L) $2\text{ }\mu\text{L}$,基因组 DNA($100\text{ ng}/\mu\text{L}$) $2\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物($20\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 和 HotStar Taq DNA 聚合酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$) $0.25\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 的反应条件为:首先 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性

15 min ,然后进入 35 个循环,每个循环 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min ,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳分离后用凝胶回收试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化。

1.2.2 GATA6 基因的 PCR 测序及序列分析 以上述纯化的扩增产物为模板,使用循环测序试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)和 GATA6 特异性扩增引物在 Veriti 型热循环仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行测序 PCR。测序 PCR 反应混合物的总体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$,包括双蒸水 $3\text{ }\mu\text{L}$,预混合液 $4\text{ }\mu\text{L}$,纯化的 DNA 片段($20\text{ ng}/\mu\text{L}$) $2\text{ }\mu\text{L}$ 和上游引物($2\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1\text{ }\mu\text{L}$ 。测序 PCR 反应条件:共 30 个循环,每个循环 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s , $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 。测序 PCR 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。将所测得的 GATA6 序列与 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)所提供的 GATA6 序列(登陆号:NM_005257)进行对比,以发现 GATA6 基因变异。对于所检测的 GATA6 基因变异,检索 PubMed(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)、SNP(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)和万方数据库(<http://librarian.wanfangdata.com.cn>)以明确所发现的基因变异是否已被报道。

1.2.3 突变氨基酸在物种进化上的保守性分析 采用在线软件 MUSCLE(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene?cmd=Retrieve&dopt=MultipleAlignment&list_uids=68449)评估突变氨基酸在物种进化上的保守性。

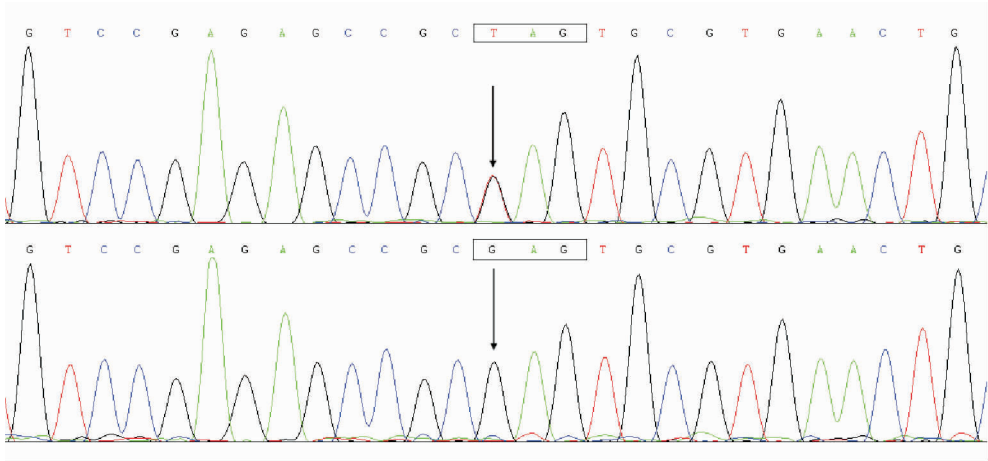
1.2.4 GATA6 基因变异的致病性预测 使用 MutationTaster(<http://www.mutationtaster.org>)在线软件预测所发现的 GATA6 基因变异是否具有致病性。

2 结果

2.1 发现 GATA6 基因新突变

通过对 132 例特发性 DCM 患者的 GATA6 基因进行测序分析,在其中 1 例患者中识别出 1 个新的杂合突变,其 GATA6 基因编码核苷酸序列第 1165 位的鸟嘌呤(guanine, G)变为胸腺嘧啶(thymine, T),即 c.1165G>T 突变。该核苷酸替代导致编码 GATA6 蛋白第 389 位谷氨酸(glutamic acid, E)的密码子变为终止密码子(X),即 p.E389X 突变。经过检索 SNP、PubMed 和万方数据库,该 GATA6 基因变异未见报道,表明该

GATA6 基因突变是新突变。GATA6 基因 c. 1165G>T 杂合突变及其野生型对照序列见图 1。



注:箭头所指分别为 GATA6 基因 c. 1165G>T 杂合突变型 T/G 和纯合野生型 G/G 序列

图 1 GATA6 基因 c. 1165G>T 杂合突变型及其野生型对照序列

		E389X	
		↓	
NP_005248.2 (人)	---DLLEDLSESR	E	-----CVNCGSIQTPL---
XP_003954430.1 (猩猩)	---DLLEDLSESR	E	-----CVNCGSIQTPL---
XP_002800933.1 (猴)	---DFLVRVHGGR	P	GPRKDLQACGWVCASRGSLDAAF---
XP_005623196.1 (犬)	---DLLEDLPESR	E	-----CVNCGSIQTPL---
NP_034388.2 (小鼠)	---DLLEDLSESR	E	-----CVNCGSIQTPL---
NP_062058.1 (大鼠)	---DLLEDLSESR	E	-----CVNCGSIQTPL---
NP_571632.1 (斑马鱼)	---HLLEEMVESR	E	-----CVNCGSMSTPL---
NP_989422.1 (蟾蜍)	---DVLDELPESR	E	-----CVNCGSVQTPL---

图 2 多物种 GATA6 蛋白序列比对分析结果

2.3 GATA6 基因 c. 1165G>T 变异为致病性突变

该 GATA6 基因变异 c. 1165G>T 经在线软件 MutationTaster 自动预测为致病性突变,该预测结论正确的概率为 1。此外,MutationTaster 数据库没有报道 GATA6 基因 c. 1165G>T 突变,进一步证实本研究所发现的 GATA6 基因突变是新突变。

3 讨论

本研究在 1 例散发性 DCM 患者中检测出了 1 个新的 GATA6 基因杂合突变 p. E389X,但在 220 名无血缘关系的健康对照者中未检测出该突变。该突变氨基酸在多物种进化上完全保守,而且在线软件功能预测分析显示该突变是致病性突变。因此,GATA6 基因 p. E389X 突变有可能是该 DCM 患者的分子病因,但该基因突变的致病性大小和具体的致病机制仍有待于进一步研究。

在人类,GATA 6 基因定位于染色体18q11.1- q11.2,

2.2 突变位点氨基酸在物种进化上保守性

多物种 GATA6 蛋白序列比对分析发现第 389 位的谷氨酸在多物种进化上完全保守(见图 2)。

其编码的转录因子蛋白由 595 个氨基酸残基组成^[12]。以前的研究发现,在胎心发育期间,GATA6 可以独自或与其转录合作伙伴 GATA4、NKX2-5 和 TBX20 等一道协同激活多个靶基因的转录表达,如心房利钠肽、α 肌凝蛋白重链和缝隙连接蛋白 CX40 等^[13-14],而且 GATA4、NKX2-5、TBX20 和 α 肌凝蛋白重链基因突变均可导致 DCM^[9]。因此推测 GATA6 基因突变可能通过降低对胎心正常发育及出生后心脏结构重构具有重要作用的靶基因的表达而导致 DCM。

动物实验表明,GATA6 基因缺陷可增加 DCM 的易感性。在小鼠胚胎发育期间,GATA6 是 GATA 族(GATA1-GATA6)中最早表达于心脏的,GATA6 双等位基因敲除可导致小鼠胚胎的内胚层发育障碍,致使胚胎发育早期死亡^[15]。虽然 GATA4 或 GATA6 单基因敲除杂合子小鼠心脏表型正常,但 GATA4 和 GATA6 双基因敲除杂合子

小鼠全部于胚胎期死亡,主要原因在于心血管发育畸形,包括薄壁心室肌、心肌发育不良、心室间隔缺损、右室双流出道、主动脉干永存、心肌细胞增殖下降和血管平滑肌细胞分化障碍^[16-17]。此外,心肌特异性敲除 GATA6(心脏 GATA6 蛋白减少 95%以上)或 GATA4 小鼠可以存活至成年,但其心功能进行性恶化,至成年时心脏扩大,而联合敲除成年小鼠心脏 GATA4 和 GATA6 则可导致 DCM^[18]。与此相反,体内或体外单独过表达 GATA6 或联合过表达 GATA6 与 GATA4 均可诱发心肌肥厚^[18-19]。这些实验研究结果表明,GATA6 在心脏胚胎发育和出生后结构重构方面起着关键作用。

本研究首次报道了散发性 DCM 相关 GATA6 基因突变,扩大了 DCM 相关基因突变谱,对 DCM 患者的遗传咨询和个体化防治具有潜在的临床意义。

参 考 文 献

[1] Qiu XB, Qu XK, Li RG, et al. CASZ1 loss-of-function mutation contributes to familial dilated cardiomyopathy[J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(9):1417-1425.

[2] Yuan F, Qiu ZH, Wang XH, et al. MEF2C loss-of-function mutation associated with familial dilated cardiomyopathy[J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(3):502-511.

[3] 徐迎佳,仇兴标,李若谷,等. 散发性扩张型心肌病相关 HAND1 基因新突变[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(43): 3371-3375.

[4] 徐迎佳,李若谷,刘华,等. 散发性扩张型心肌病相关 TBX20 基因突变谱分析[J]. 国际心血管病杂志, 2017, 44(3):153-156.

[5] 梁华生,张黔桓,陈泗林. 扩张型心肌病致病基因的研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2016, 43(1):22-24.

[6] 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.

[7] Zhao L, Xu JH, Xu WJ, et al. A novel GATA4 loss-of-function mutation responsible for familial dilated cardiomyopathy[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(3):654-660.

[8] Zhang XL, Dai N, Tang K, et al. GATA5 loss-of-function mutation in familial dilated cardiomyopathy[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(3):763-770.

[9] Xu L, Zhao L, Yuan F, et al. GATA6 loss-of-function mutations contribute to familial dilated cardiomyopathy[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(5):1315-1322.

[10] 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.

[11] Peterkin T, Gibson A, Loose M, et al. The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(1):83-94.

[12] Suzuki E, Evans T, Lowry J, et al. The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals [J]. Genomics, 1996, 38(3):283-290.

[13] Molkentin JD. The Zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50):38949-38952.

[14] Rémond MC, Iaffaldano G, O'quinn MP, et al. GATA6 reporter gene reveals myocardial phenotypic heterogeneity that is related to variations in gap junction coupling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(5):H1952-H1964.

[15] Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, et al. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development [J]. Development, 1999, 126(4):723-732.

[16] Xin M, Davis CA, Molkentin JD, et al. A threshold of GATA4 and GATA6 expression is required for cardiovascular development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(30): 11189-11194.

[17] Zhao R, Watt AJ, Battle MA, et al. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice[J]. Dev Biol, 2008, 317(2): 614-619.

[18] van Berlo JH, Elrod JW, van den Hoogenhof MM, et al. The transcription factor GATA-6 regulates pathological cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2010, 107(8):1032-1040.

[19] Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, et al. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 2001, 276(32):30245-30253.

(收稿日期:2017-12-15 修回日期:2018-07-03)

(本文编辑:丁媛媛)