

特发性肺动脉高压相关 SOX17 基因新突变分析

王珊珊 王天明 叶显撑 刘兴元

【摘要】 目的:寻找特发性肺动脉高压相关 SOX17 基因新突变。 方法:收集 58 例特发性肺动脉高压患儿和 200 名健康对照者的临床资料及血标本,纯化基因组 DNA。测序分析研究对象的 SOX17 基因以发现致特发性肺动脉高压突变。利用在线计算机程序分析突变氨基酸在物种进化上的保守性及其致病性。 结果:在 2 例特发性肺动脉高压患儿中各发现 1 种 SOX17 基因新突变,分别为 c. 232T>A 和 c. 281A>T 突变,即 p. Trp78Arg 和 p. His94Leu 突变。该突变不存在于 200 名健康对照者。数据分析表明突变氨基酸在多物种进化上完全保守且均具有致病性。 结论:特发性肺动脉高压相关 SOX17 基因新突变对特发性肺动脉高压患者的遗传咨询及精准防治具有潜在的临床意义。

【关键词】 肺动脉高压;分子遗传学;转录因子;SOX17;基因突变

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.04.013

Novel mutations of SOX17 gene in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension

WANG Shanshan¹, WANG Tianming², YE Xiancheng³, LIU Xingyuan². 1. Department of Neonatal Pediatrics, First Maternity and Infant Hospital, Tongji University, Shanghai 201204; 2. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065; 3. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

【Abstract】 Objective: To identify novel mutations in the SOX17 gene contributing to idiopathic pulmonary arterial hypertension (PAH). **Methods:** The clinical data and blood samples were collected from 58 unrelated children with idiopathic PAH and 200 healthy controls. Genomic DNA was purified from blood leucocytes. Sequencing analysis of the SOX17 gene was carried out for identification of novel mutation. The online software was used to analyze whether the mutated amino acid was evolutionarily conserved. The disease-causing potential of the identified mutation was also predicted. **Results:** Two novel SOX17 mutations, c. 232T>A and c. 281A>T, namely p. Trp78Arg and p. His94Leu, were identified in two unrelated children with idiopathic PAH, which was absent from 200 health control individuals. The altered amino acid was completely conserved evolutionarily across species, and the mutations were predicted to be pathogenic. **Conclusions:** The novel SOX17 mutation is involved in idiopathic PAH, which has potential clinical implications for the genetic counseling and precise prevention and treatment of idiopathic PAH.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; Molecular genetics; Transcriptional factor; SOX17; Genetic mutation

基金项目:上海市自然科学基金(16ZR1432500)

作者单位:201204 上海,同济大学附属第一妇婴保健院新生儿科(王珊珊);200065 上海,同济大学附属同济医院儿科(王天明、刘兴元),药剂科(叶显撑)

通信作者:刘兴元, E-mail:liuxingyuan402@163.com

肺动脉高压(PAH)以肺小动脉进行性闭塞、肺血管阻力增加、肺动脉压升高为特征,儿童的发病率约为 5/100 万~8/100 万,成人的发病率约为 15/100 万~50/100 万^[1-2]。严重的 PAH 可导致右心室肥厚、心力衰竭或死亡,PAH 患者在第 1 年和第 3 年的死亡率分别高达 7%~32% 和 23%~61%^[3-4]。既往研究显示,尽管环境危险因素可导致 PAH,但特发性 PAH 主要与遗传缺陷有关,已经发现 10 余个突变基因可导致特发性 PAH,包括 *BMPR2*、*TBX4*、*KCNK3* 和 *ABCC8* 等^[5-6]。此外,全基因组关联分析发现,一些常见的遗传变异可显著增加特发性 PAH 的易感性^[7]。尽管如此,因 PAH 具有显著的遗传异质性,大多特发性 PAH 患者的遗传缺陷仍未明确。

1 对象与方法

1.1 研究对象

纳入 2016 年 3 月至 2019 年 8 月就诊于同济大学附属同济医院及附属第一妇婴保健院儿科的 58 例特发性 PAH 患儿,设为病例组,其中男 28 例,女 30 例,年龄为 3~13 岁,平均年龄(8±5)岁。对照组为 200 名性别、年龄和种族均匹配的健康儿童,其中男 96 例,女 104 例,年龄为 3~14 岁,平均年龄(8±6)岁。所有研究对象均经过询问病史、体格检查、常规血液化验、超声心动图、胸片检查。特发性 PAH 的诊断依据世界卫生组织最新修订的标准:(1)平均肺动脉压>20 mmHg;(2)平均肺动脉楔压≤15 mmHg;(3)肺血管阻力≥3 Wood 单位(1 Wood 单位=80 dynes/s·cm⁵)^[8]。病例组 PAH 家族史阳性 11 例(约占 19%),健康对照组 PAH 家族史均为阴性,两组均无传统 PAH 危险因

素。本研究遵循医学伦理学原则,经研究对象的法定监护人知情同意后收集其临床资料及外周静脉全血约 1 mL,应用血液基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)抽提基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 SOX17 基因的扩增 从 GenBank 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000008.11?from=54457935&to=54460892&report=genbank)中获取 SOX17 的基因组 DNA 序列(登陆号:NC_000008.11)。借助在线计算机软件 Primer3web(<http://primer3.ut.ee>),设计可特异性扩增 SOX17 基因编码外显子及外显子两侧的部分内含子(包括剪接供体、受体及部分 5'和 3'端非翻译区)的引物序列见表 1。使用热启动 Taq DNA 聚合酶(德国 Qiagen 公司),以每位研究对象的基因组 DNA 为模板,应用 SOX17 特异性扩增引物等聚合酶链反应(PCR)试剂,在 T100 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上扩增 SOX17 基因目的片段。PCR 反应物的总体积是 25 μL,包括 10×PCR 缓冲液 2.5 μL,双蒸水 12.25 μL,5×Q 溶液 5 μL,dNTP(各 2.5 mmol/L)2 μL,基因组 DNA(100 ng/μL)2 μL,上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL 和热启动 Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL。PCR 反应条件的设置如前所示^[9-10],即:首先 95℃预变性 15 min,随后进入 35 个循环,每 1 个循环包括 94℃变性 30 s、62℃退火 30 s 及 72℃延伸 1 min,最后 72℃延伸 6 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后割胶回收,用 QIAquick 凝胶纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化 PCR 产物。

表 1 扩增 SOX17 基因编码外显子、剪接供体和受体及部分 5'和 3'端非翻译区的引物序列

外显子	正向引物	反向引物	大小
1	5'-GGCATCTCAGTGCCTCACTC-3'	5'-GCTCGCAAAGAACAGTTTGG-3'	493 bp
2-A	5'-GCGCAATTCAAAGTCTGAGG-3'	5'-AGACCTGCGCGTAGCTGTAG-3'	576 bp
2-B	5'-ACTACCGCGACTGCCAGAGT-3'	5'-AGTGTGTAACACTGCTTCTGG-3'	691 bp

1.2.2 SOX17 基因的 DNA 测序分析 以纯化过的 PCR 产物为模板,用 DNA 循环测序试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)和 1 条 SOX17 基因特异性扩增引物在 ProFlex 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行 DNA 测序反应。测序 PCR 混合物的体积是 10 μL,其中预混合液 4 μL,纯化的 DNA 片段(30 ng/μL)1 μL,双蒸水 4 μL,上

游引物(2 μmol/L)1 μL。DNA 测序 PCR 的条件见前期研究^[9-10]:共 30 个循环,每 1 个循环 95℃变性 20 s,50℃退火 15 s,60℃延伸 1 min。DNA 测序 PCR 产物通过 QIAquick 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化,然后上样于 3130 XL 型 DNA 测序仪(美国 Applied Biosystem 公司)进行测序。将所测出的 SOX17 序列与 Nucleotide 数据库

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>) 中的 SOX17 序列(登陆号:NM_022454.4)进行对比分析以发现 SOX17 基因变异。如发现 SOX17 基因变异,采用相同的方法测序分析 200 名健康对照者的 SOX17 基因,同时检索 PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)、HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>)、SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 和 万方 (<http://www.wanfangdata.com.cn>) 数据库,确定所发现的 SOX17 基因变异是否已有报道。

1.2.3 SOX17 蛋白突变氨基酸的保守性评估 使用在线计算机软件 MUSCLE(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene?cmd=Retrieve&dopt=MultipleAlignment&list_uids=7948),自动比对 SOX17 基因所编码蛋白的突变位点氨基酸在 SOX17 蛋白序列已知物种进化上的保守性。

1.2.4 SOX17 基因突变的致病性分析 应用在线计算机软件 Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>)、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 和 PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) 预测所发现的 SOX17 基因突变的致病性。

1.3 统计学分析

分类变量用绝对数值或百分比表示,连续变量用均数±标准差表示。两组连续变量的比较应用非配对 Student's *t* 检验,两组分类变量的比较使用 Fisher's 精确概率检验或 Pearson's χ^2 检验。以双侧检验值 $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 发现 SOX17 基因新突变

两组的性别与种族均无显著性差异(经 Pearson's χ^2 检验, $P>0.05$),年龄差异也无统计学意义(经 Student's *t* 检验, $P>0.05$)。病例组的 PAH 家族史阳性率显著高于对照组(Fisher's 精确概率检验, $P<0.05$)。通过对 58 例特发性 PAH 患儿的 SOX17 基因进行 DNA 测序分析,2 例家族史阴性的特发性 PAH 患儿各发现了 1 种新的杂合错义突变。

(1)1 例 9 岁的男性特发性 PAH 患儿(平均肺动脉压 27 mmHg,平均肺动脉楔压 6 mmHg,肺血

管阻力 8 Wood 单位),其 SOX17 基因编码核苷酸序列第 232 位的胸腺嘧啶(T)变成腺嘌呤(A),即 c.232T>A 突变,相当于 SOX17 蛋白的氨基酸序列第 78 位编码色氨酸(Trp)的密码子变为编码精氨酸(Arg)的密码子,即 p.Trp78Arg 突变。

(2)1 例 6 岁的女性特发性 PAH 患儿(平均肺动脉压 25 mmHg,平均肺动脉楔压 5 mmHg,肺血管阻力 6 Wood 单位),其 SOX17 基因编码核苷酸序列第 281 位的 A 变成 T,即 c.281A>T 突变,相当于 SOX17 蛋白的氨基酸序列第 94 位编码组氨酸(His)的密码子变为编码亮氨酸(Leu)的密码子,即 p.His94Leu 突变。

对 200 名健康对照者的 SOX17 基因进行 DNA 测序筛查没有发现基因突变。经过检索 PubMed、HGMD、SNP 和 万方数据库,本研究发现的 2 种 SOX17 基因突变 c.232T>A 和 c.281A>T,即 p.Trp78Arg 和 p.His94Leu 突变均未见报道。该特发性 PAH 男性患儿的 SOX17 基因 c.232T>A 杂合突变及其纯合野生型对照序列见图 1。该特发性 PAH 女性患儿的 SOX17 基因 c.281A>T 杂合突变及其纯合野生型对照序列见图 2。

2.2 蛋白 Trp78Arg 和 His94Leu 突变所改变的氨基酸在进化上高度保守

如图 3 所示,在人 SOX17 基因编码的 SOX17 蛋白(NP_071899.1),第 78 位的色氨酸和第 94 位的组氨酸在大猩猩(XP_001153136.1)、猴(XP_001083536.1)、狗(XP_544084.3)、牛(NP_001193180.1)、小鼠(NP_035571.1)、大鼠(NP_001101372.1)、禽(NP_001034415.1)和蟾蜍(NP_989425.1)等物种 SOX17 蛋白进化上完全保守。

2.3 所发现的 SOX17 基因突变具有致病性

本研究发现的 SOX17 基因突变 c.232T>A 和 c.281A>T,即 p.Trp78Arg 和 p.His94Leu 突变被在线计算机软件 Mutation Taster、PolyPhen-2 和 PROVEAN 预测均具有致病性,其中被 Mutation Taster 预测均为致病性突变,这一预测结果的正确率约等于 1;被 PolyPhen-2 预测均为很可能具有致病性,预测分数均为 1(敏感性 0,特异性 1.00);被 PROVEAN 预测均为恶性突变,预测分数分别为 -12.151 和 -9.721(≥ -2.5 为良性多态)。

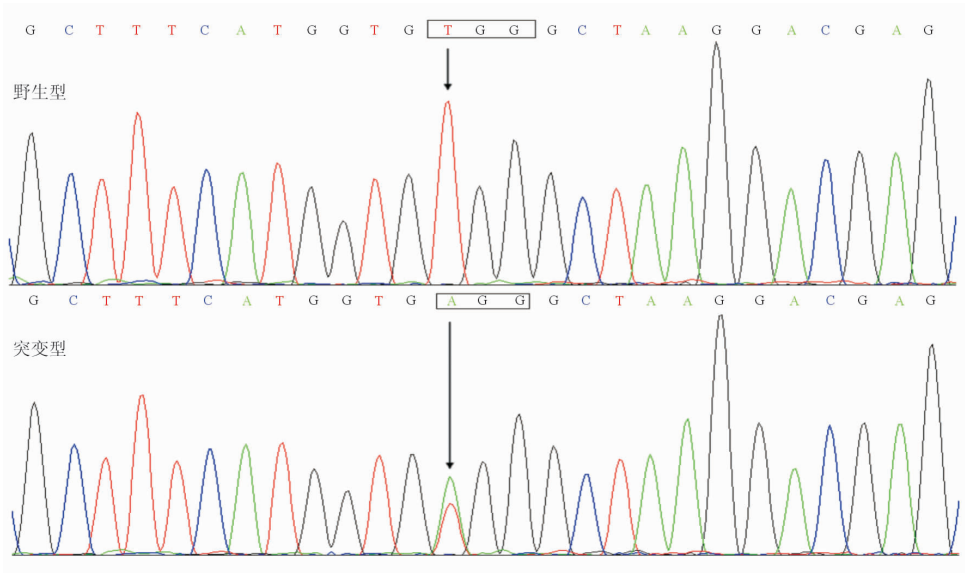


图 1 SOX17 基因 c. 232T>A 杂合突变及其纯合野生型对照序列

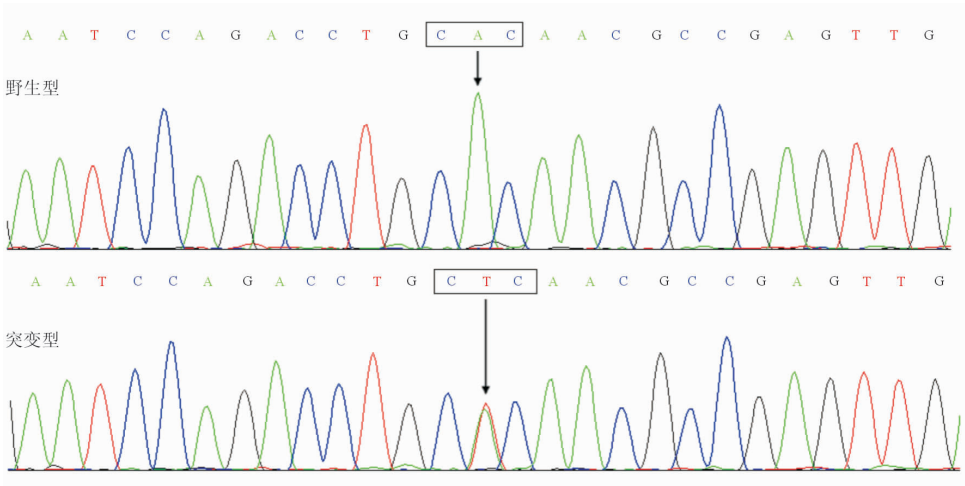


图 2 SOX17 基因 c. 281A>T 杂合突变及其纯合野生型对照序列

	63	W78R	H94L	109
NP_071899.1 (人)	---KGESRIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
XP_001153136.1 (大猩猩)	---KGESRIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
XP_001083536.1 (猴)	---KGESRIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
XP_544084.3 (狗)	---KSESRIIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
NP_001193180.1 (牛)	---KGESRIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
NP_035571.1 (小鼠)	---KAESRIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
NP_001101372.1 (大鼠)	---KAESRIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
NP_001034415.1 (禽)	---KGEARIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	
NP_989425.1 (蟾蜍)	---KAEARIRRFMNAFMV	W AKDERKRLAQQNPDFL	H NAELSKMLGKSWKAL---	

注:箭头所指分别为 SOX17 蛋白第 78 位的色氨酸和第 94 位的组氨酸

图 3 多物种 SOX17 蛋白的氨基酸序列比对分析

3 讨论

本研究在 2 例无血缘关系的特发性 PAH 患儿中检测出 2 种新的 SOX17 基因杂合错义突变 c. 232T>A 和 c. 281A>T, 即 p. Trp78Arg 和 p. His94Leu 突变, 计算机模拟功能分析显示这 2 种突变均具有致病性。因此, SOX17 基因突变 c. 232T>A (p. Trp78Arg) 和 c. 281A>T (p. His94Leu) 极有可能是该特发性 PAH 患儿的分子病因, 不过该基因突变导致特发性 PAH 的病理机制仍待进一步研究。

SOX17 基因功能缺陷是人类特发性 PAH 的发生机制之一。SOX17 基因定位于人染色体 8q11.23, 编码 1 种由 4146 个氨基酸所组成的转录因子蛋白, 广泛表达于心、肺及血管, 通过 Wnt/ β -catenin 和 Notch 信号通路在心血管胚胎发育及出生后结构重构方面发挥重要作用^[11-12]。在胚胎血管中, SOX17 蛋白特异性地表达于动脉内皮细胞^[13-15]。在小鼠胚胎或出生后视网膜, 内皮特异性敲除 SOX17 基因可导致动脉定向分化障碍、胚胎死亡或动静脉血管畸形^[14]。在间充质祖细胞中, 条件性敲除 SOX17 基因的结果表明 SOX17 蛋白是胚胎期肺血管形态发生所必须的, SOX17 蛋白缺失可导致心血管发育畸形^[16]。在血管紧张素 II 灌注小鼠模型中, 内皮特异性敲除 SOX17 基因可导致颅内动脉瘤^[17]。人类全基因组关联分析显示 SOX17 基因变异与颅内动脉瘤相关^[18]。

既往的研究提示, SOX17 基因变异与人类 PAH 有关。Zhu 等^[19]对 256 例先天性心脏病合并 PAH 患者进行了外显子组测序分析, 在 SOX17 基因发现致病突变后, 又在 413 例 PAH (无先天性心脏病) 患者中对 SOX17 基因进行了测序分析, 结果在约 3.2% 的先天性心脏病合并 PAH 患者、约 0.7% 的单纯 PAH 患者中发现了 SOX17 基因致病突变^[12]。Gräf 等^[19]对 1038 例无血缘关系的 PAH 患者和 6385 例无 PAH 对照者进行了全基因组测序分析, 结果发现 PAH 患者组致病性 SOX17 基因变异显著高于无 PAH 对照组, 在 1038 例 PAH 先证者中, 9 例检测出了 SOX17 基因致病性变异。Hiraide 等^[20]对 6 个日本家系中的 12 例 PAH 患者, 12 名无症状家系成员以及 128 例特发性 PAH 先证者进行了外显子组测序分析, 结果发现 4 例 PAH 患者 (其中 1 例患者伴发房间隔缺损, 另 2 例患者伴发卵圆孔未闭) 和 1 名无症状家系成员携带致病性 SOX17 基因变异。本研究对 58 例无血缘关

系的特发性 PAH 患者的 SOX17 基因进行了测序分析, 结果在 2 例患者中发现了 2 种新的 SOX17 基因变异。上述临床研究表明, SOX17 基因变异可能是部分特发性 PAH 患者的分子病因, 但具体的致病机制仍有待深入研究。

总之, 本研究发现了 2 种新的 SOX17 基因突变可导致特发性 PAH, 这对特发性 PAH 患者的遗传咨询、预后风险评估和精准防治具有潜在的意义。

参 考 文 献

- [1] Southgate L, Machado RD, Gräf S, et al. Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(2):85-95.
- [2] Welch CL, Chung WK. Genetics and other omics in pediatric pulmonary arterial hypertension[J]. Chest, 2020, 157(5):1287-1295.
- [3] Mandras SA, Mehta HS, Vaidya A. Pulmonary hypertension: a brief guide for clinicians[J]. Mayo Clin Proc, 2020, 95(9):1978-1988.
- [4] Rosenkranz S, Howard LS, Gombert-Maitland M, et al. Systemic consequences of pulmonary hypertension and right-sided heart failure[J]. Circulation, 2020, 141(8):678-693.
- [5] Welch CL, Chung WK. Genetics and other omics in pediatric pulmonary arterial hypertension[J]. Chest, 2020, 157(5):1287-1295.
- [6] Southgate L, Machado RD, Gräf S, et al. Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(2):85-95.
- [7] Rhodes CJ, Batai K, Bleda M, et al. Genetic determinants of risk in pulmonary arterial hypertension: international genome-wide association studies and meta-analysis [J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(3):227-238.
- [8] Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. Eur Respir J, 2019, 53(1):1801913.
- [9] 董斌斌, 刘兴元, 杨奕清. 先天性心脏缺损相关 NR2F2 基因新突变研究[J]. 国际心血管病杂志, 2019, 46(4):240-243.
- [10] 乔祺, 杨晨曦, 顾佳宁, 等. 散发性扩张型心肌病相关 ISL1 基因突变分析[J]. 国际心血管病杂志, 2020, 47(3):162-167.
- [11] Francois M, Koopman P, Beltrame M. SoxF genes: key players in the development of the cardiovascular system[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(3):445-448.
- [12] Zhu N, Welch CL, Wang J, et al. Rare variants in SOX17 are associated with pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease[J]. Genome Med, 2018, 10(1):56.
- [13] Liao WP, Uetzmann L, Burtcher I, et al. Generation of a mouse line expressing Sox17-driven Cre recombinase with specific activity in arteries [J]. Genesis, 2009, 47(7):476-483.

- [14] Corada M, Orsenigo F, Morini MF, et al. Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity[J]. Nat Commun, 2013, 4:2609.
- [15] Sacilotto N, Monteiro R, Fritzsche M, et al. Analysis of Dll4 regulation reveals a combinatorial role for sox and notch in arterial development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(29):11893-11898.
- [16] Lange AW, Haitchi HM, LeCras TD, et al. Sox17 is required for normal pulmonary vascular morphogenesis[J]. Dev Biol, 2014, 387(1):109-120.
- [17] Lee S, Kim IK, Ahn JS, et al. Deficiency of endothelium-specific transcription factor Sox17 induces intracranial aneurysm[J]. Circulation, 2015, 131(11):995-1005.
- [18] Foroud T, Koller DL, Lai D, et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysms confirms role of Anril and SOX17 in disease risk[J]. Stroke, 2012, 43(11):2846-2852.
- [19] Gräf S, Haimel M, Bleda M, et al. Identification of novel rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):1416.
- [20] Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, et al. SOX17 mutations in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(9):1231-1233.

(收稿:2021-01-20 修回:2021-05-07)

(本文编辑:丁媛媛)

~~~~~

(上接第 235 页)

- [19] Sandoval Y, Smith SW, Thordsen SE, Apple FS. Supply/demand type 2 myocardial infarction: should we be paying more attention [J]. Am Coll Cardiol, 2014, 63 (20): 2079-2087.
- [20] Saaby L, Poulsen TS, Hosbond S, et al. Classification of myocardial infarction: frequency and features of type 2 myocardial infarction [J]. Am J Med, 2013, 126 (9): 789-797.
- [21] Baron T, Hambræus K, Sundström J, et al. Impact on long-term mortality of presence of obstructive coronary artery disease and classification of myocardial infarction[J]. Am J Med, 2016, 129(4):398-406.
- [22] Lindahl B, Baron T, Erlinge D, et al. Medical therapy for secondary prevention and long-term outcome in patients with myocardial infarction with nonobstructive coronary artery disease[J]. Circulation, 2017, 135(16):1481-1489.

(收稿:2020-10-12 修回:2021-03-11)

(本文编辑:程雪艳)