

## · 临床研究 ·

特发性心房颤动致病基因 *PRRX1* 新突变的发现及功能分析

李宁 仇兴标 徐迎佳 杨奕清 刘宗军

**【摘要】 目的:**探索特发性心房颤动(房颤)致病基因 *PRRX1* 新突变并分析其功能。**方法:**收集 192 例特发性房颤患者和 212 名健康者的外周静脉血标本,提取基因组 DNA,测序分析 *PRRX1* 基因以发现致房颤突变。克隆 *PRRX1* 基因,构建其野生型表达载体,通过定位诱变获得突变体,转染 Hela 细胞,通过双荧光报告基因分析其功能特性。**结果:**在其中 1 例特发性房颤患者发现 *PRRX1* 基因新突变,即 NM\_022716.4: c.425T>C; p.(Phe142Ser) 突变。该突变不存在于 212 名志愿者,也不存在于其余 191 例房颤患者中。功能分析显示突变型 *PRRX1* 对靶基因 *SHOX2* 的转录激活作用显著降低。**结论:**发现房颤致病基因 *PRRX1* 新的功能丧失性突变,对房颤的精准预防具有潜在的临床意义。

**【关键词】** 心房颤动;医学遗传学;转录调节; *PRRX1* 基因;报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.03.011

**Identification and functional analysis of a new mutation in the *PRRX1* gene responsible for idiopathic atrial fibrillation** LI Ning<sup>1</sup>, Qiu Xingbiao<sup>2</sup>, XU Yingjia<sup>3</sup>, YANG Yiqing<sup>3</sup>, LIU Zongjun<sup>1</sup>.

1. Department of Cardiology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; 2. Department of Cardiology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030; 3. Department of Cardiology and Cardiovascular Research Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

**【Abstract】 Objective:** To explore novel mutations in the causative gene *PRRX1* in idiopathic atrial fibrillation (AF) and analyze its function. **Methods:** Peripheral venous blood samples were collected from 192 unrelated patients suffering from idiopathic AF and 212 unrelated healthy volunteers employed as control group. Genomic DNA was extracted from the blood leucocytes of each group. Sequencing analysis of the *PRRX1* gene was conducted to explore an AF-based mutation. The *PRRX1* gene was cloned with its wild-type expression vector was constructed. The mutant-type *PRRX1* expression vector was obtained via site-directed mutagenesis. Hela cells were transiently transfected, and the functional characteristics of the mutant-type *PRRX1* were assayed with dual-luciferase reporters. **Results:** A new *PRRX1* mutation, NM\_022716.4: c.425T>C; p.(Phe142Ser), was discovered in a patient suffering from idiopathic AF, which was not observed in the 212 unrelated healthy volunteers or in the other 191 AF patients. The results of functional analysis demonstrated that the mutation significantly decreased the ability of *PRRX1* to transactivate the expression of *SHOX2* (a target gene of *PRRX1*). **Conclusion:** A new loss-of-function of AF-based mutation in the *PRRX1* gene has potential clinical significance for precise prevention of AF.

**【Keywords】** Atrial fibrillation; Medical genetics; Transcriptional regulation; *PRRX1*; Reporter gene assay

基金项目:国家自然科学基金(81470372)

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院心内科(李宁,刘宗军);200030 上海交通大学附属胸科医院心内科(仇兴标);200240 复旦大学附属上海市第五人民医院心内科,心血管研究室(徐迎佳,杨奕清)

通信作者:刘宗军, E-mail: lzj72@126.com

心房颤动(房颤)是最常见的心律失常,在一般人群中的发病率约为 1%,但随年龄增长而急剧增加,80 岁以上老年人群的发病率在 10% 以上<sup>[1-2]</sup>。特发性房颤主要是由遗传缺陷所致,已经报道了至少 140 个房颤相关遗传位点,还发现了 50 多个突变基因可导致房颤,包括 *KCNQ1*、*KCNE1*、*KCNE2* 和 *SCN5A* 等基因<sup>[3-6]</sup>。然而,由于房颤具有显著的遗传异质性,大多数特发性房颤患者的遗传病因不明。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2018 年 1 月至 2019 年 12 月,病例组入选 192 例汉族特发性房颤患者,其中男性 103 例,女性 89 例,年龄为 32~60 岁,平均年龄为(47±9)岁。对照组为 212 名性别、年龄和种族均完全匹配的健康志愿者,其中男性 115 例,女性 97 例,年龄为 32~60 岁,平均年龄为(47±8)岁。所有研究参与对象均经过详细临床评估,包括病史、体检、心电图和心超检查。根据 2014 年颁布的房颤处理指南诊断特发性房颤<sup>[7]</sup>。病例组中 39 例患者有房颤家族史,约占全部患者的 20%;对照组均无房颤家族史。2 组研究对象均没有发现可诱发房颤的环境危险因素。本研究符合世界卫生组织发布的医学伦理学原则,并获得上海交通大学附属胸科医院伦理委员会的批准(伦理批准号:KS1101)。经过研究对象的知情同意后,采集其临床数据及外周静脉

全血标本,用血液基因组 DNA 纯化试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)提取基因组 DNA。

### 1.2 方法

1.2.1 *PRRX1* 基因扩增 从 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)下载 *PRRX1* 的基因组 DNA 序列(登陆号:NC\_000001.11),借助在线软件 Primer3(<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>),设计通过聚合酶链反应(PCR)特异性扩增 *PRRX1* 基因编码外显子、剪接供体/受体及 5' 和 3' 端部分非翻译区的引物序列,见表 1。以基因组 DNA 为模板,应用所设计、合成的 *PRRX1* 基因特异性扩增引物及 Hotstart Taq DNA 聚合酶试剂盒(德国 Qiagen 公司),在型 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上进行 *PRRX1* 基因片段的扩增。配制 PCR 反应混合物,的总体积为 25 μL,包括 10×PCR 缓冲液 2.5 μL、双蒸水 12.25 μL、上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL、5×Q 溶液 5 μL、dNTP(2.5 mmol/L)2 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL 和基因组 DNA(50 ng/μL)2 μL。PCR 的条件参考文献[7-8],即 95℃预变性 15 min,随后进入 36 个热循环,每个热循环由 94℃变性 30 s、62℃退火 30 s 和 72℃延伸 1 min 构成,最后 72℃延伸 8 min。PCR 产物经过 1.3% 的琼脂糖凝胶电泳分离后回收目的 DNA、用凝胶 DNA 纯化试剂盒(美国 Bio-Tek 公司)纯化。

表1 扩增*PRRX1*基因编码区、剪接位点及5'和3'端部分非翻译区的引物序列

外显子	正向引物	反向引物	大小
1	5'-GCACAACGCTCTGCTCTACA-3'	5'-GGCTCTAGCTGCCCTACACG-3'	538 bp
2	5'-GGCAACAGCCAAGCATTAGAGT-3'	5'-GGGTACTACTTGGTGCCAGCC-3'	433 bp
3	5'-TTGCTGTCCCGTGGGTAAGT-3'	5'-AACATGACCGACCGCTGAGA-3'	526 bp
4-A	5'-GCAGTGCTTTGCTTCGTGCT-3'	5'-TAAACCCTACCCCAAGCAGCC-3'	467 bp
4-B	5'-TGCAGCTTTGTGAACTAATGCC-3'	5'-GCTGAACCTAGCTGAAGAAGCC-3'	498 bp

1.2.2 Sanger 测序分析 *PRRX1* 基因 以纯化好的 PCR 产物为模板,使用 1 条 *PRRX1* 基因特异性扩增引物及 DNA 测序试剂盒在 PCR 仪上进行测序反应。配制测序反应混合物,总体积为 10 μL,其中 DNA 片段(40 ng/μL)1 μL、上游 PCR 引物(2 μmol/L)1 μL、预混合液 4 μL、双蒸水 4 μL。测序 PCR 的条件参考文献[7-8],设定 30 个热循

环,每个热循环由 95℃变性 20 s、50℃退火 15 s 和 60℃延伸 1 min 构成。测序反应产物纯化后在 DNA 测序仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上进行凝胶电泳测序。对比分析所测的 *PRRX1* 基因序列与 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 *PRRX1* 基因序列(登陆号:NM\_022716.4)以发现 *PRRX1* 基因突变。一旦

发现 *PRRX1* 基因突变, 测序分析 212 名对照者的 *PRRX1* 基因, 同时检索 SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 和 PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 数据库以核实该 *PRRX1* 基因突变是否为新突变。

**1.2.3 *PRRX1* 蛋白之突变位点氨基酸的保守性分析** 使用 MUSCLE 软件 (<https://drive5.com/muscle/>), 对比分析 *PRRX1* 蛋白之突变位点氨基酸在跨物种进化上的保守性。

**1.2.4 *PRRX1* 基因新突变的致病性模拟分析** 应用在线计算机程序 PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/>)、MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) 和 PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>) 模拟分析 *PRRX1* 基因新突变的致病性。

**1.2.5 *PRRX1* 基因突变体的功能分析** 野生型 *PRRX1* 的真核表达载体 *PRRX1*-pcDNA3.1 及其靶基因 *SHOX2* 启动子驱动萤火虫荧光素酶表达的报告基因表达载体 *SHOX2*-luc 的构建如前所述<sup>[9]</sup>。以野生型 *PRRX1*-pcDNA3.1 表达质粒为模板, 应用定点诱变试剂盒 (美国 Stratagene 公司) 和 1 对长 31 个碱基的互补引物 (以突变点为中心), 通过 PCR 获得突变型 *PRRX1*-pcDNA3.1 表达质粒, 然后应用 Dpn I 酶 (美国 NEB 公司) 切除野生型 *PRRX1*-pcDNA3.1 模板, 并通过 DNA 测序证实。Hela 细胞培养及多种表达载体瞬时共转染方法见参考文献 [9]。同时共转染海肾荧光素酶报告基因表达载体 pGL4.75 (美国 Promega 公司) 作为内对照, 目的是消除转染效率对结果的可能影响。转染表达质粒后 48 h 收集并裂解 Hela 细胞, 选用双荧光素酶 (报告基因) 分析试剂盒 (美国 Promega 公司), 参考试剂使用说明在荧光定量分析仪上分析细胞裂解液的荧光素酶活性。以萤火虫荧光素酶的活性与海肾荧光素酶的活性之比表示靶基因 *SHOX2* 启动子的转录活性<sup>[7]</sup>。

### 1.3 统计学分析

两组连续变量如入选研究者的年龄、靶基因 *SHOX2* 启动子的转录活性等的比较应用非配对 Student's *t* 检验; 两组分类变量如入选对象的性别、种族、阳性家族史的发生率等的比较使用 Pearson's  $\chi^2$  检验或 Fisher's 精确概率检验。双侧检验概率值以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 发现 *PRRX1* 基因新突变

病例组与对照组均为汉族, 性别构成无显著性差异 (经 Pearson's  $\chi^2$  检验  $P > 0.05$ ), 年龄也无统计学差异 (经 Student's *t* 检验  $P > 0.05$ ), 但病例组的房颤家族史阳性率显著高于对照组 (经 Fisher's 精确概率检验  $P < 0.05$ )。

对 192 例特发性房颤患者的 *PRRX1* 基因进行测序分析, 在其中 1 例 49 岁的男性家族史阴性的特发性房颤患者检测出 1 种 *PRRX1* 基因杂合错义突变, 即 NM\_022716.4: c.425T>C; p.(Phe142Ser) 突变。对 212 名健康对照者 *PRRX1* 基因测序分析, 没有检测出基因突变。检索 SNP 和 PubMed 数据库, 均未见报道本研究所发现的基因突变。该例特发性房颤患者的 *PRRX1* 基因 c.141T>C 杂合突变和其纯合野生型对照序列, 见图 1。

### 2.2 *PRRX1* 的 Phe142Ser 变异所改变的氨基酸在物种进化上高度保守

人 *PRRX1* 蛋白 (NP\_073207.1) 第 142 位的苯丙氨酸在猩猩 (XP\_001141191.1)、猴 (XP\_001097390.1)、犬 (XP\_850725.1)、牛 (NP\_001075208.1)、小鼠 (NP\_035257.1)、大鼠 (NP\_722543.1)、禽 (NP\_001007822.1)、斑马鱼 (NP\_956344.1 和 NP\_999899.1) 和蟾蜍 (NP\_004913839.1) 的 *PRRX1* 蛋白进化上完全保守。

### 2.3 新发现的 *PRRX1* 基因变异是致病性突变

该 *PRRX1* 基因新变异 c.425T>C 即 p.(Phe142Ser) 变异经在线软件 PolyPhen-2、Mutation Taster 及 PROVEAN 均预测为致病性突变, 其中被 PolyPhen-2 预测为“很可能致病”, 预测分数为 0.997 (敏感性 0.41, 特异性 0.98); 被 MutationTaster 预测为“致病”, 正确预测的概率约等于 1 ( $> 0.999$ ); 被 PROVEAN 预测为“恶性”, 预测分数为 -7.60 (临界值为 -2.5, 大于该值为良性多态)。

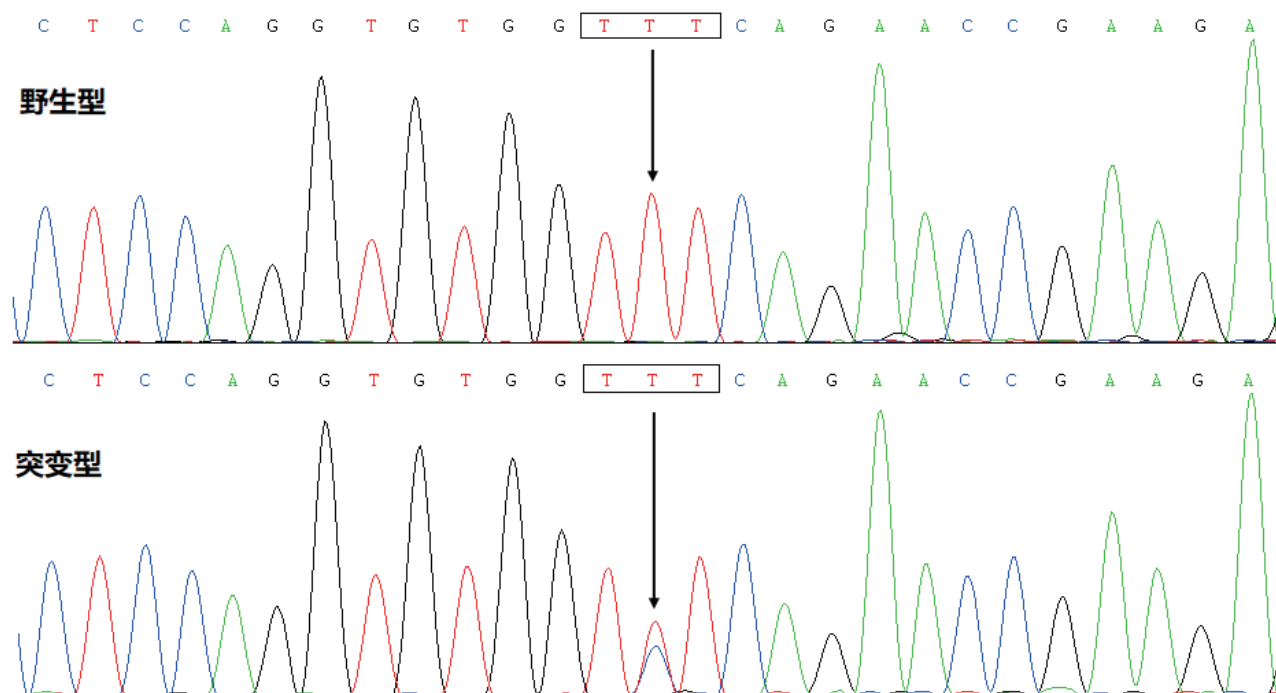
### 2.4 该突变型 *PRRX1* 对靶基因的转录激活功能显著降低

在转染了多种基因表达载体的 Hela 细胞中, 200 ng 的野生型 *PRRX1*-pcDNA3.1 (*PRRX1*) 和等量 (200 ng) 的 Phe142Ser- 突变型 *PRRX1* (Phe142Ser) 对靶基因 *SHOX2* 启动子的转录激活作用分别约为 39 倍和 1 倍 ( $t = 19.78$ ,  $P = 0.000\ 04$ ); 而在同时转染了 100 ng 的野生型 *PRRX1*-pcDNA3.1 (*PRRX1*) 和等量 (100 ng) 的



Phe142Ser- 突变型 *PRRX1* (Phe142Ser) 时, 所诱导的转录激活作用约为 22 倍, 显著低于 200 ng 的

野生型 *PRRX1*-pcDNA3.1 (*PRRX1*) 所诱导的转录激活作用 [约 39 倍 ( $t=7.017$ ,  $P=0.00217$ ) ]。



注:箭头指向 *PRRX1* 基因 c.425T>C 杂合变异型 C/T 和纯合野生型 T/T  
图1 *PRRX1* 基因c.425T>C突变(杂合子)和其野生型(纯合子)对照DNA序列

### 3 讨论

本研究在 1 例特发性房颤患者中检测出 1 种新的 *PRRX1* 基因杂合错义突变 NM\_022716.4: c.425T>C; p.(Phe142Ser), 经多个在线计算机软件模拟功能分析均显示该突变具有致病性, 多基因表达细胞功能研究表明 Phe142Ser- 突变型 *PRRX1* 对靶基因 *SHOX2* 启动子的转录激活作用显著降低。因此, *PRRX1* 基因突变 c.425T>C 或 p.(Phe142Ser) 是该例特发性房颤患者的分子病因, 但也不能完全排除其他突变基因可能也有一定的作用, 全基因组测序分析及深入的功能研究有助于明确这一问题。

定位于人类 1 号染色体 1q24.2 的 *PRRX1* 基因编码一种重要的同源盒转录因子, 大量表达于胚胎发育期的心血管系统, 如心脏、胸腔内大血管和肺静脉<sup>[10-12]</sup>, 而肺静脉是房颤触发灶的最常见来源部位, 临床上肺静脉隔离可以终止大部分房颤<sup>[13]</sup>。既往的研究证实 *PRRX1* 可以调节上皮-基质转换, 这是人类心血管发育的标志性事件<sup>[14]</sup>。在 *PRRX1* 基因敲除小鼠, 心血管发育畸形, 包括主动脉弓曲率及方位异常、食管后右锁骨下动脉畸形

以及动脉导管错位延长, 突显了 *PRRX1* 对血管及血管周边基质发育的关键调控效应<sup>[15]</sup>。近期有研究发现, *PRRX1* 可以与靶基因 *SHOX2* 和 *ISL1* 启动子结合进而转录激活 *SHOX2* 和 *ISL1* 的表达<sup>[9]</sup>, 而 *SHOX2* 和 *ISL1* 对心脏尤其是其起搏传导系统的发育具有重要的调节作用<sup>[16-17]</sup>, 无论是 *SHOX2* 还是 *ISL1* 基因功能缺失性突变均可导致房颤<sup>[18-19]</sup>。这些研究结果表明, *PRRX1* 基因功能缺失性突变可能通过下调 *SHOX2* 和 *ISL1* 等靶基因的表达而诱发房颤, *PRRX1* 基因单倍型不足是人类房颤的发病机制之一。

值得一提的是, 全基因组关联研究发现位于 *PRRX1* 基因上游约 63 kb 的 1 个单核苷酸多态 (rs3903239) 显著增加房颤的发病风险<sup>[20]</sup>。功能分析显示基因组区域的这一变异显著降低 *PRRX1* 基因启动子的转录活性, 进而显著减少 *PRRX1* 蛋白在左心房组织中的表达量<sup>[20]</sup>。进一步的功能分析发现, *PRRX1* 蛋白缺失可显著缩短人类心房肌细胞动作电位时程和有效不应期, 从而易于形成折返环, 诱发房颤<sup>[20]</sup>。此外, Guo 等<sup>[9]</sup> 首先发现了

*PRRX1* 基因的 2 个功能缺失性突变可通过下调靶基因 *SHOX2* 和 *ISL1* 的表达而导致家族房颤。本研究发现 1 种的 *PRRX1* 基因杂合错义突变可导致特发性房颤,扩大了房颤相关 *PRRX1* 基因突变谱。

总之,本研究揭示了 1 种新的 *PRRX1* 基因突变可导致特发性房颤,这对房颤的早期精准预防及预后风险评估具有一定的意义。

#### 参 考 文 献

- [1] Tian XT, Xu YJ, Yang YQ. Gender differences in arrhythmias: focused on atrial fibrillation[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2020, 13(1):85-96.
- [2] Huang X, Li Y, Zhang J, et al. The molecular genetic basis of atrial fibrillation[J]. Hum Genet, 2020, 139 (12):1485-1498.
- [3] Kim JA, Chelu MG, Li N. Genetics of atrial fibrillation[J]. Curr Opin Cardiol, 2021, 36(3):281-287.
- [4] Roselli C, Rienstra M, Ellinor PT. Genetics of atrial fibrillation in 2020: *GWAS*, genome sequencing, polygenic risk, and beyond[J]. Circ Res, 2020, 127(1):21-33.
- [5] Ragab AAY, Sitorus GDS, Brundel BBJM, et al. The genetic puzzle of familial atrial fibrillation[J]. Front Cardiovasc Med, 2020, 7:14.
- [6] January CT, Wann LS, Alpert JS, et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society[J]. Circulation, 2014, 130(23):e199-e267.
- [7] 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.
- [8] 乔祺, 杨晨曦, 顾佳宁, 等. *KLF15* 基因突变导致心房颤动的机制研究[J]. 国际心血管病杂志, 2021, 48(1):53-57.
- [9] Guo XJ, Qiu XB, Wang J, et al. *PRRX1* loss-of-function mutations underlying familial atrial fibrillation[J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(24):e023517.
- [10] Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, et al. Patterns of paired-related homeobox genes *PRX1* and *PRX2* suggest involvement in matrix modulation in the developing chick vascular system[J]. Dev Dyn, 1998, 213(1):59-70.
- [11] Leussink B, Brouwer A, el Khattabi M, et al. Expression patterns of the paired-related homeobox genes *MHox/Prx1* and *S8/Prx2* suggest roles in development of the heart and the forebrain[J]. Mech Dev, 1995, 52(1):51-64.
- [12] Chesterman ES, Kern MJ. Comparative analysis of *Prx1* and *Prx2* expression in mice provides evidence for incomplete compensation[J]. Anat Rec, 2002, 266(1):1-4.
- [13] Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins[J]. N Engl J Med, 1998, 339(10):659-666.
- [14] Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer *Prx1*[J]. Cancer Cell, 2012, 22(6):709-724.
- [15] Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, Wisse LJ, et al. Loss of function of the *Prx1* and *Prx2* homeobox genes alters architecture of the great elastic arteries and ductus arteriosus[J]. Virchows Arch, 2000, 436(1):12-19.
- [16] Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, et al. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaker development[J]. Circulation, 2007, 115(14):1830-1838.
- [17] Liang X, Zhang Q, Cattaneo P, et al. Transcription factor *ISL1* is essential for pacemaker development and function[J]. J Clin Invest, 2015, 125(8):3256-3268.
- [18] Li N, Wang ZS, Wang XH, et al. A *SHOX2* loss-of-function mutation underlying familial atrial fibrillation[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(13):1564-1572.
- [19] Wu SH, Wang XH, Xu YJ, et al. *ISL1* loss-of-function variation causes familial atrial fibrillation[J]. Eur J Med Genet, 2020, 63(11):104029.
- [20] Tucker NR, Dolmatova EV, Lin H, et al. Diminished *PRRX1* expression is associated with increased risk of atrial fibrillation and shortening of the cardiac action potential[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2017, 10(5):e001902.

( 收稿:2021-12-10 修回:2022-02-25 )

( 本文编辑:丁媛媛 )