

· 临床研究 ·

先天性房间隔缺损致病基因 *KLF13* 新突变的识别与功能分析

陈春英 刘兴元 杨奕清

【摘要】 目的:探索房间隔缺损致病基因 *KLF13* 新突变。 **方法:**对 175 例先天性房间隔缺损患儿和 217 名健康者的 *KLF13* 基因进行测序分析以发现新的致病突变。克隆 *KLF13* 基因,构建野生型 *KLF13* 表达质粒 *KLF13*-pcDNA3.1,通过定位诱变获得突变型 *KLF13*-pcDNA3.1,转染 NIH3T3 细胞,通过报告基因分析研究突变体的功能特性。 **结果:**在 1 例散发性先天性房间隔缺损患儿发现 *KLF13* 基因新突变,即 NM_015995.4: c.85G>T; p.(Glu29*) 突变。该突变不存在于 217 名健康者。生化分析表明突变型 *KLF13* 对靶基因 *ACTC1* 的转录激活功能丧失。 **结论:**发现 *KLF13* 基因功能丧失性新突变可导致先天性房间隔缺损,这对先天性房间隔缺损的个体化医学防治有潜在的临床意义。

【关键词】 房间隔缺损;分子遗传学;转录调节; *KLF13* 基因;报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.02.012

Identification and functional assay of a new *KLF13* mutation underpinning congenital atrial septal defect CHEN Chunying¹, LIU Xingyuan¹, YANG Yiqing². 1. Department of Pediatrics, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065; 2. Department of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, and Central Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

【Abstract】 Objective: To investigate a novel mutation in the *KLF13* gene predisposing to congenital atrial septal defect. **Methods:** Sequencing analysis of *KLF13* was performed in 175 children affected with congenital atrial septal defect and 217 healthy subjects for a new mutation underlying atrial septal defect. The *KLF13* gene was cloned and its wild-type expression plasmid *KLF13*-pcDNA3.1 was constructed. The mutant-type *KLF13*-pcDNA3.1 plasmid was created via site-targeted mutagenesis. NIH3T3 cells were transiently transfected with various expression plasmids, and the functional characteristics of the mutant-type *KLF13* were analyzed by reporter assay. **Results:** A new *KLF13* mutation, NM_015995.4: c.85G>T; p.(Glu29*), was discovered in a child with sporadic congenital atrial septal defect, which was absent from the 217 healthy individuals. Biological analysis revealed that the Glu29*-mutant *KLF13* had no transcriptional activation on its target gene *ACTC1*. **Conclusion:** A new loss-of-function *KLF13* mutation is identified to cause congenital atrial septal defect, which suggests potential implications for the personalized medical prevention and treatment of congenital atrial septal defect.

【Keywords】 Atrial septal defect; Molecular genetics; Transcriptional regulation; *KLF13*; Reporter gene assay

先天性心脏病是指心脏、瓣膜以及胸腔内大血管发育畸形,根据解剖和血流动力学特点可分

为 20 种以上不同的临床类型,在我国房间隔缺损(ASD)是最常见的类型,ASD 在活产新生儿中的发病率高达 8.93%~10.6%^[1-2]。ASD 可导致慢性充血性心力衰竭、感染性心内膜炎、反复肺部感染等并发症,严重影响患者的身心健康^[2]。医学遗传学研究表明先天性 ASD 主要是由遗传缺陷

基金项目:上海市自然科学基金(16ZR1432500)

作者单位:200065 上海,同济大学医学院附属同济医院儿科(陈春英,刘兴元);200240 上海,复旦大学附属上海市第五人民医院心内科、心血管研究室、中心实验室(杨奕清)

通信作者:刘兴元, E-mail: liuxingyuan402@tongji.edu.cn

所致,已经发现了多个 ASD 致病基因,包括心脏转录因子基因 *NKX2-5*、*GATA4*、*GATA6*、*TBX20* 和 *TBX5*^[3]。近年来的研究发现,心脏转录因子 *KLF13* 可与 *GATA4* 或 *TBX5* 协同转录激活靶基因,从而在心脏发育方面发挥关键作用^[4-5]。因此,有理由将 *KLF13* 作为 ASD 的重要候选基因进行研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象

自 2017 年 1 月至 2020 年 11 月,175 例汉族先天性 CHD 患儿入选本研究病例组,其中 92 例为男性,83 例为女性,年龄 2~15 岁,平均年龄(8±6)岁。217 名汉族健康志愿者入选对照组,其中男性 114 名,女性 103 名,年龄 2~15 岁,平均年龄(8±5)岁。所有入选本研究者均经家族史及医疗史回顾、体格检查、多普勒彩色心脏超声心动图检查和常规生化检验。根据心脏超声检查结果或心脏手术记录诊断 ASD^[6]。2 组均无可诱发 ASD 的环境易患因素。本研究符合医学伦理学规范,并获得同济大学医学院附属同济医院医学伦理委员会的批准。在获得研究对象知情同意后,收集其临床数据和静脉血液标本。

1.2 方法

1.2.1 *KLF13* 基因的体外扩增 采用基因组 DNA 纯化试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)提取基因组 DNA。通过聚合酶链反应(PCR)体外扩增 *KLF13* 基因整个编码区和剪接受体/供体序列以及部分 5' 和 3' 端非翻译区,引物序列参考文献[7]。以基因组 DNA 为模板,应用化学合成的上述 *KLF13* 基因特异性扩增引物和热启动 DNA 聚合酶(德国 Qiagen 公司)等试剂,在 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上扩增 *KLF13* 基因。PCR 混合物的总体积为 25 μL,其中 5×Q 液 5 μL,双蒸水 13.25 μL,10×PCR 缓冲液 2.5 μL,dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL,上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL,热启动 DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL,基因组 DNA (50 ng/μL) 1 μL。PCR 的条件设定参考文献[8]:95 °C 预变性 15 min,随后进行 38 次热循环,每 1 循环包括 94 °C 变性 30 s、62 °C 退火 30 s 和 72 °C 延伸 1 min,最后 72 °C 延伸 6 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后用凝胶 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化回收。

1.2.2 *KLF13* 基因的 Sanger 测序分析 以纯化后的 PCR 产物为模板,使用 1 条 *KLF13* 基因特异性扩

增引物及 DNA 测序试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)在 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行 Sanger 测序反应。测序反应混合物的体积为 20 μL,其中包括 PCR 产物即 *KLF13* 基因 DNA 片段(30 ng/μL) 2 μL、正向引物(2 μmol/L) 2 μL、双蒸水 8 μL 和预混合液 8 μL。测序反应条件的设定参考文献[8]:总计 30 次热循环,每个循环包括 95 °C 变性 20 s、50 °C 退火 15 s 和 60 °C 延伸 1 min。测序反应产物经纯化回收后在 DNA 测序仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上进行凝胶电泳测序。通过对比分析所测出得的 *KLF13* 基因序列与核苷酸数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 *KLF13* 基因序列(登陆号:NM_015995.4)以识别 *KLF13* 基因突变。一旦识别出 *KLF13* 基因突变,则测序分析 217 名健康对照者的 *KLF13* 基因,同时检索 PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)、HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 和万方数据库(<https://g.wanfangdata.com.cn/index.html>),以明确本研究所发现的 *KLF13* 基因突变是否已经报道。

1.2.3 *KLF13* 基因突变的致病性预测分析 借助在线计算机软件 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>)模拟分析 *KLF13* 基因突变的致病性。

1.2.4 *KLF13* 基因突变的功能效应分析 野生型 *KLF13* 的表达质粒 *KLF13*-pcDNA3.1 及其靶基因 *ACTC1* 启动子驱动萤火虫荧光素酶(luc)表达的报告基因表达质粒 *ACTC1*-luc 的构建如参考文献[7]所述。以野生型 *KLF13* 为模板,化学合成 1 对以突变点为中心、长 31 个碱基的互补引物,使用定位诱变试剂盒(美国 Stratagene 公司)通过 PCR 获得突变型 *KLF13*-pcDNA3.1。使用 DNA 酶 Dpn I (美国 NEB 公司)切除野生型 *KLF13*-pcDNA3.1 模板,经过 DNA 测序证实获得序列正确的突变型 *KLF13*-pcDNA3.1。NIH3T3 细胞培养及多种表达质粒共转染如参考文献[7]所述。NIH3T3 细胞转染表达质粒后 48 h 收集、裂解细胞。应用双荧光报告基因(萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶基因)分析试剂盒(美国 Promega 公司)在荧光定量分析仪(美国 Promega 公司)上分析荧光强度即荧光素酶活性。以两种荧光素酶活性的比值(萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性)表示靶基因

ACTC1 启动子的转录活性^[7]。

1.3 统计学分析

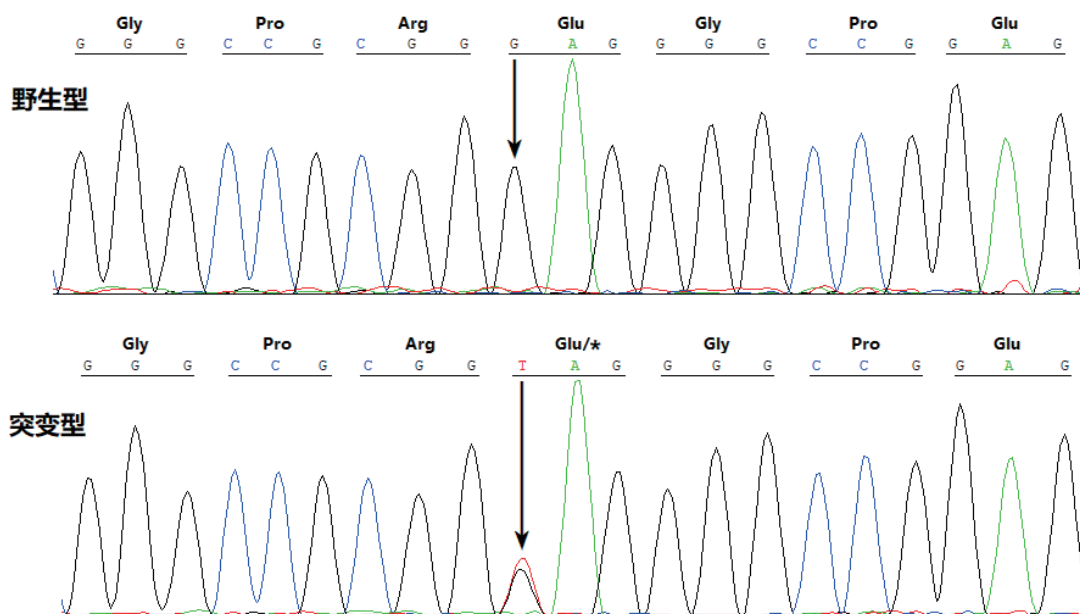
2 组连续变量数据如入选本研究对象的年龄、靶基因 *ACTC1* 启动子的转录活性等（以均数 ± 标准差表示）的比较用非配对 Student's *t* 检验；2 组分类变量数据如入选本研究对象的性别、种族、ASD 阳性家族史等的比较用 Pearson's χ^2 检验或 Fisher's 精确概率检验。以双侧检验概率值 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 发现了 *KLF13* 基因新的致病突变

本研究 ASD 病例组 ($n=175$) 和健康对照组 ($n=217$) 均是中国汉族人，组间性别构成差异无统计学意义（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 $P > 0.05$ ），但 ASD 病例组有阳性家族史 16 例，健康对照组均无阳性家族史，2 组 ASD 家族史阳性率差异有统计学意义（经 Fisher's 精确概率检验 $P < 0.05$ ）。通过对 175 例 ASD 患儿的 *KLF13* 基因进行 Sanger 测序分析，在其中 1 例 5 岁家族史阴性的男性先天 ASD 患儿中发现 1 种 *KLF13* 基因杂合无义突变，即 NM_015995.4: c.85G>T; p.(Glu29*) 突变。该 *KLF13* 基因突变在 217 名健康儿童没有检出，在 PubMed、HGMD、SNP 和万方数据库也均未见报道，表明该 *KLF13* 基因变异是 1 种新突变。该例 ASD 患儿的 *KLF13* 基因 c.85G>T 杂合突变及纯合野生型 DNA 序列见图 1。



注：箭头指向 *KLF13* 基因之 c.85G>T 杂合突变型 G/T 和纯合野生型 G/G

图1 *KLF13* 基因之 c.85G>T 突变型（杂合子）及野生型（纯合子）对照 DNA 序列

2.2 *KLF13* 基因新变异 c.85G>T 是致病性突变

KLF13 基因新变异 c.85G>T 被 MutationTaster 软件预测为致病性突变，该预测结果正确的概率趋近于 1 (> 0.9999)。

2.3 Glu29*-突变型 *KLF13* 对靶基因 *ACTC1* 的转录激活效应丧失

在转染了目的基因表达质粒的 NIH3T3 细胞，100 ng 的野生型 *KLF13*-pcDNA3.1 和等量 (100 ng) 的 Glu29*-突变型 *KLF13*-pcDNA3.1 对靶基因 *ACTC1* 启动子的转录激活作用分别约为 13 倍

(12.70 ± 1.71) 和 1 倍 (1.10 ± 0.30)，2 组（野生型与突变型）之间差异有统计学意义 ($t = 11.55$, $P < 0.01$)；而在同时转染了 50 ng 的野生型 *KLF13*-pcDNA3.1 和等量 (50 ng) 的 Glu29*-突变型 *KLF13*-pcDNA3.1 时，所诱导的转录激活作用约为 7 倍 (7.16 ± 1.05)，显著低于 100 ng 的野生型 *KLF13*-pcDNA3.1 所诱导的转录激活作用（即约 13 倍），2 组之间（野生型与杂合突变型）差异有统计学意义 ($t = 4.78$, $P = 0.01$)。

3 讨论

本研究在 1 例散发性 ASD 患儿中发现了 1 种新的 *KLF13* 基因杂合无义突变, 即 NM_015995.4: c.85G>T; p.(Glu29*) 突变。该 *KLF13* 基因突变不存在于 217 名健康对照儿童, 在 PubMed、HGMD、SNP 和万方数据库也均未见报道。MutationTaster 软件模拟分析结果显示该变异为致病性突变。报告基因分析表明 Glu29*- 突变型 *KLF13* 对靶基因 *ACTC1* 启动子的转录激活功能丧失, 而 *ACTC1* 基因功能障碍已被发现可导致 ASD^[9-10], 提示 *KLF13* 基因新突变 c.85G>T 或 p.(Glu29*) 是该例先天性 ASD 患儿的分子病因。

KLF13 基因定位于人类 15 号染色体 15q13.3, 编码 1 种属于 Kruppel 样因子 (KLF) 家族的转录因子, 为其 13 号成员即 *KLF13*, 由 288 个氨基酸残基组成^[7]。在胚胎发育期间 *KLF13* 大量表达于心脏, 对心血管的正常发育具有重要的调控作用^[4-5,11]。既往研究证实 *KLF13* 可单独或与 *GATA4* 或 *TBX5* 协同转录激活对心脏形态发生发挥关键作用的靶基因如 *ACTC1* 和 *VEGF* 的表达^[4-5], 而且已经发现 *GATA4*、*TBX5*、*ACTC1* 和 *VEGF* 基因突变均可导致 ASD^[3,9-10,12]。本研究发现可导致 ASD 的 *KLF13* 基因功能丧失性新突变。这些研究结果提示 *KLF13* 基因单倍型不足是人类 ASD 的分子遗传学机制之一。

KLF13 基因缺陷与 ASD 的关系已经在实验动物获得证实。在蟾蜍, *KLF13* 在胚胎发育期主要大量表达于心脏, *KLF13* 基因沉默可导致 ASD 和心室致密化不全, 与 *Gata4* 基因杂合性缺失的人或小鼠的表型类似^[4]。在小鼠, *KLF13* 在整个胚胎发育间广泛表达, 在发育期的心脏包括心房肌、心室小梁、房室垫和动脉干高表达^[4,13]。*KLF13* 基因敲除纯合子小鼠心脏扩大、心血管病变和胚胎期死亡率增加^[14]。尽管 *KLF13* 基因敲除杂合子小鼠无明显心脏缺损, 但 *KLF13* 和 *Tbx5* 双基因杂合性缺失可显著增加 *Tbx5* 单基因杂合性缺失所致的心脏间隔缺损的发生率^[4]。这些实验动物研究结果提示 *KLF13* 基因单倍型不足可导致人类 ASD 的发生。

值得一提的是, *KLF13* 基因与人类先天性心脏病的关系已有报道。Li 等^[11]对 309 例无亲缘关系的先天性心脏病患者的 *KLF13* 基因进行了测序分析, 在其中 2 例患者中各发现 1 种杂合错义突变, 即在 1 例室间隔缺损、三尖瓣发育不

良和 ASD 患者发现 NM_015995.4: c.467G>A; p.(Ser156Asn) 突变, 而在另 1 例大动脉转位患者发现 NM_015995.4: c.487C>T; p.(Pro163Ser) 突变。功能分析显示 Ser156Asn- 突变型 *KLF13* 对靶基因的转录激活功能增强, 而 Pro163Ser- 突变型 *KLF13* 对靶基因的转录激活功能降低。Wang 等^[7]对 1 个先天性右心室双流出道合并室间隔缺损家系进行外显子组测序分析, 结果发现 1 个杂合性无义突变即 NM_015995.4: c.370G>T; p.(Glu124*) 突变。生化分析显示该突变使 *KLF13* 对靶基因的转录激活功能丧失。Abhinav 等^[1]对 316 例无血缘关系的先天性心脏病患者的 *KLF13* 基因进行了测序分析, 在其中 1 例动脉导管未闭、室间隔缺损合并主动脉二瓣畸形的患者发现 1 种杂合无义突变即 NM_015995.4: c.430G>T; p.(Glu144*) 突变。家系分析显示该突变在家系成员中与先天性心脏病共分离, 功能研究显示该突变使 *KLF13* 对靶基因的转录激活功能丧失。此外, 包含 *KLF13* 基因的人类染色体区域 (15q13.3) 的微小缺失或重复可导致多种心脏发育缺损^[15-16]。本研究发现 1 种 *KLF13* 基因功能缺失性新突变, 可导致单纯性 ASD, 扩大了 ASD 相关 *KLF13* 基因突变谱。

总之, 本研究发现了 1 种新的 *KLF13* 基因功能丧失性突变, 该突变可导致 ASD, 这不仅揭示了 ASD 新的分子机制, 对 ASD 的早期精准预防 and 个体化预后风险评估也具有潜在的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Abhinav P, Zhang GF, Zhao CM, et al. A novel *KLF13* mutation underlying congenital patent ductus arteriosus and ventricular septal defect, as well as bicuspid aortic valve[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(4):311.
- [2] Liu Y, Cao Y, Li Y, et al. Novel genetic variants of sporadic atrial septal defect (ASD) in a Chinese population identified by whole-exome sequencing (WES)[J]. Med Sci Monit, 2018, 24:1340-1358.
- [3] Li YJ, Yang YQ. An update on the molecular diagnosis of congenital heart disease: focus on loss-of-function mutations[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2017, 17(4):393-401.
- [4] Lavallée G, Andelfinger G, Nadeau M, et al. The Kruppel-like transcription factor *KLF13* is a novel regulator of heart development[J]. EMBO J, 2006, 25(21):5201-5213.
- [5] Darwich R, Li W, Yamak A, et al. *KLF13* is a genetic modifier of the holt-oram syndrome gene *TBX5*[J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(5):942-954.
- [6] Sun R, Liu M, Lu L, et al. Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments[J]. Cell Biochem

- Biophys, 2015, 72(3):857-860.
- [7] Wang SS, Wang TM, Qiao XH, et al. KLF13 loss-of-function variation contributes to familial congenital heart defects[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(21):11273-11285.
- [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] Greenway SC, McLeod R, Hume S, et al. Exome sequencing identifies a novel variant in ACTC1 associated with familial atrial septal defect[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(2):181-187.
- [10] Frank D, Yusuf Rangrez A, Friedrich C, et al. Cardiac alpha-actin (ACTC1) gene mutation causes atrial-septal defects associated with late-onset dilated cardiomyopathy[J]. Circ Genom Precis Med, 2019, 12(8):e002491.
- [11] Li W, Li B, Li T, et al. Identification and analysis of KLF13 variants in patients with congenital heart disease[J]. BMC Med Genet, 2020, 21(1):78.
- [12] Ackerman C, Locke AE, Feingold E, et al. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in down-syndrome-associated atrioventricular septal defects[J]. Am J Hum Genet, 2012, 91(4):646-659.
- [13] Martin KM, Metcalfe JC, Kemp PR. Expression of Klf9 and Klf13 in mouse development[J]. Mech Dev, 2001, 103(1-2):149-151.
- [14] Gordon AR, Outram SV, Keramatipour M, et al. Splenomegaly and modified erythropoiesis in KLF13^{-/-} mice[J]. J Biol Chem, 2008, 283(18):11897-11904.
- [15] van Bon BWM, Mefford HC, Menten B, et al. Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome[J]. J Med Genet, 2009, 46(8):511-523.
- [16] Lowther C, Costain G, Stavropoulos DJ, et al. Delineating the 15q13.3 microdeletion phenotype: a case series and comprehensive review of the literature[J]. Genet Med, 2015, 17(2):149-157.
- (收稿:2022-06-07 修回:2023-02-08)
(本文编辑:丁媛媛)

=====

(上接第 98 页)

- [40] Beckmann K, Garmo H, Lindahl B, et al. Spironolactone use is associated with lower prostate cancer risk: a population-wide case-control study[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2020, 23(3):527-533.
- [41] Hiebert BM, Janzen BW, Sanjanwala RM, et al. Impact of spironolactone exposure on prostate cancer incidence amongst men with heart failure: a Pharmacoepidemiological study[J]. Br J Clin Pharmacol, 2021, 87(4):1801-1813.
- [42] Wei C, Bovonratwet P, Gu A, et al. Spironolactone use does not increase the risk of female breast cancer recurrence: a retrospective analysis[J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 83(4):1021-1027.
- [43] Liu PP, McMenamin ÚC, Spence AD, et al. Furosemide use and survival in patients with esophageal or gastric cancer: a population-based cohort study[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):1017.
- (收稿:2021-12-10 修回:2023-01-19)
(本文编辑:王雨婷)