

## · 临床研究 ·

先天性动脉导管未闭致病基因 *SOX18* 新突变的识别与功能研究

董斌斌 冒山林 陈果 刘兴元 杨奕清

**【摘要】 目的:**探索先天性动脉导管未闭致病基因 *SOX18* 新突变。 **方法:**入选 134 例散发性先天性动脉导管未闭 (PDA) 患儿和 202 名性别匹配的同种族健康者, 对其 *SOX18* 基因进行 Sanger 测序分析以寻找致病新突变。克隆 *SOX18* 基因, 构建野生型 *SOX18* 真核表达质粒, 通过定点诱变制备突变型 *SOX18* 真核表达质粒, 脂质体转染 HeLa 细胞后, 双报告基因定量分析突变的功能效应。 **结果:**在 1 例散发性先天性 PDA 患儿中发现了 *SOX18* 基因新突变, 即 NM\_018419.3:c.313C>T;p.(Gln105\*) 突变。该突变不存在于其他 PDA 患儿和对照者。双报告基因分析显示突变型 *SOX18* 对靶基因 *NR2F2* 的转录激活作用丧失。 **结论:***SOX18* 基因功能缺失性新突变可导致散发性先天性 PDA, 这对先天性 PDA 的精准医学防治有潜在的临床意义。

**【关键词】** 动脉导管未闭; 医学遗传学; *SOX18* 基因; 定位诱变; 报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.06.015

**Identification and functional assessment of a novel *SOX18* mutation predisposing to congenital patent ductus arteriosus** DONG Binbin<sup>1</sup>, MAO Shanlin<sup>2</sup>, CHEN Guo<sup>3</sup>, LIU Xingyuan<sup>4</sup>, YANG Yiqing<sup>5</sup>. 1. Department of Pediatrics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040; 2. Department of Emergency and Critical Care Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040; 3. Department of Pediatrics, Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810099; 4. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065; 5. Department of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, Central Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

**【Abstract】 Objective:** To explore a new mutation in the *SOX18* gene underpinning congenital patent ductus arteriosus. **Methods:** 134 children suffering from sporadic congenital patent ductus arteriosus and 202 sex- and ethnicity-matched healthy children were recruited. Sanger sequencing analysis of the *SOX18* gene was conducted to detect a new mutation. The *SOX18* gene was cloned and its wild-type eukaryotic expression plasmid *SOX18*-pcDNA3.1 was constructed. The mutant-type *SOX18*-pcDNA3.1 eukaryotic expression plasmid was yielded through site-directed mutagenesis. HeLa cells were transfected with expression plasmids using lipofectamine, and the functional effect of mutant-type *SOX18* was quantitatively assessed via dual-reporter gene assay. **Results:** A novel *SOX18* mutation, i.e., NM\_018419.3:c.313C>T;p.(Gln105\*), was detected in a boy with sporadic congenital patent ductus arteriosus, which was not observed in 202 healthy controls. Dual-reporter gene analysis unveiled that Gln105\*-mutant *SOX18* lost the ability to transcriptionally activate its target gene *NR2F2*. **Conclusion:** The present study suggests that a novel loss-of-function *SOX18* mutation may be responsible for sporadic congenital patent ductus arteriosus.

**【Key words】** Patent ductus arteriosus; Medical genetics; *SOX18* gene; Site-directed mutagenesis; Reporter gene assay

基金项目: 上海市自然科学基金 (16ZR1432500)

作者单位: 200040 上海, 复旦大学附属华山医院儿科 (董斌斌), 急重症医学科 (冒山林); 810099 西宁, 青海红十字医院儿科 (陈果); 200065 上海, 同济大学附属同济医院儿科 (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

动脉导管未闭(PDA)是最常见的先天性心脏畸形之一,在足月产新生儿中的发病率约为0.5‰,在早产儿中的发病率高达8‰<sup>[1]</sup>。先天性PDA可因持续的主一肺动脉分流导致肺动脉高压、感染性心内膜炎、充血性心力衰竭甚至死亡<sup>[1]</sup>。既往研究表明,遗传缺陷和环境危险因素均可导致先天性PDA<sup>[1]</sup>。除了染色体异常可导致先天性PDA外,单基因突变也可导致先天性PDA,包括 *PTPN11*、*TBX5*、*TFAP2B*、*MYH11*、*GJA5*、*PRRX1*、*KLF13*、*ILS1* 和 *MEF2C*<sup>[1-5]</sup>。Shi 等<sup>[6]</sup>发现,转录因子基因 *SOX18* 突变可导致家族性PDA。然而,*SOX18* 基因突变是否可导致散发性先天性PDA仍有待研究。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

自2018年4月至2022年7月,来自同济大学附属同济医院134例汉族散发性先天性PDA患儿入选本研究病例组,其中79例为男性,55例为女性,年龄为2~14岁,平均年龄为(6±4)岁。同期202名汉族健康体检者入选本研究对照组,其中男性120名,女性82名,年龄为2~14岁,平均年龄为(6±3)岁。全部入选者均经过家族史及病史调查、详细体检和超声心动图检查。依据超声心动图检查结果或心脏手术病史记录诊断PDA<sup>[3]</sup>。2组入选者均排除了已知的可诱发PDA的环境危险因素。本研究遵守医学伦理学规范,并且获得同济大学附属同济医院医学伦理委员会的批准。经研究对象知情同意后,收集其临床信息和血液标本,常规提取基因组DNA。

### 1.2 方法

1.2.1 *SOX18* 基因扩增 通过聚合酶链反应(PCR)扩增 *SOX18* 基因编码区和剪接位点,引物序列见参考文献[6]。以入选对象的基因组DNA为模板,应用合成的上述 *SOX18* 基因特异性扩增引物和DNA聚合酶(德国Qiagen公司)等试剂,在PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)上通过PCR扩增 *SOX18* 基因。PCR混合液的总体积设定为25 μL,其中包含有双蒸水12.25 μL、5×Q液5 μL、10×PCR缓冲液2.5 μL、上、下游引物(20 μmol/L)各0.5 μL、DNA聚合酶(5 U/μL)0.25 μL、dNTP(2.5 mmol/L)2 μL和模板基因组DNA(30 ng/μL)2 μL。PCR的条件见参考文献[7]:首先95℃预变性15 min,随后进入35个热循环,

每1个循环包括94℃变性30 s、62℃退火30 s和72℃延伸1 min,最后72℃延伸5 min。PCR产物经过1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后割胶回收,使用凝胶DNA纯化试剂盒(德国Qiagen公司)进行纯化。

1.2.2 *SOX18* 基因的PCR测序分析 以经过纯化的PCR产物为模板,使用1条 *SOX18* 基因扩增引物和DNA测序试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)在PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)上进行Sanger测序PCR。测序PCR混合液的体积为20 μL,其中包含有PCR产物即 *SOX18* 基因DNA片段(20 ng/μL)2 μL、正向引物(2 μmol/L)1 μL、双蒸水9 μL和预混合液8 μL。测序PCR条件见参考文献[7]:总计30个循环,每1个循环包括95℃变性20 s、50℃退火15 s和60℃延伸1 min。测序PCR产物经纯化试剂盒(德国Qiagen公司)纯化后在遗传分析仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)上进行凝胶电泳测序。通过比较分析所测的 *SOX18* 基因序列与核苷酸数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 *SOX18* 基因序列(登陆号:NM\_018419.3)可识别出 *SOX18* 基因突变。一旦发现 *SOX18* 基因突变,则测序分析202名健康对照者的 *SOX18* 基因,同时检索万方数据库(<https://s.wanfangdata.com.cn/advanced-search/paper>)、PubMed数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)、人类基因突变数据库HGMD(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)和单核苷酸多态数据库SNP(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>),以明确所检测出的 *SOX18* 基因突变是否已有报道。

1.2.3 *SOX18* 基因突变的效应 通过在线计算机程序Mutation Taster 2021(<https://www.genecascade.org/MutationTaster2021/#transcript>)模拟分析所发现的 *SOX18* 基因突变的致病性。

1.2.4 *SOX18* 基因突变体的功能研究 野生型 *SOX18* 的表达质粒SOX18-pcDNA3.1及其靶基因 *NR2F2* 启动子驱动报告基因即萤火虫荧光素酶(*luc*)基因表达的NR2F2-*luc*的重组构建见参考文献[6]。以野生型SOX18-pcDNA3.1为模板,合成一对以突变点为中心、长各31个碱基的互补引物(正向引物序列:5'-CGCAAGCGGCTG GCTTAGCAGAACCCGGACC-3';反向引物序列:5'-GGTCCGGGTTCTGCTAAGCCAGCCGCTTG

CG-3'), 使用定点诱变试剂盒 (美国 Stratagene 公司) 通过 PCR 产生突变型 SOX18-pcDNA3.1。经过 DNA 酶 Dpn I (美国 NEB 公司) 切除野生型 SOX18-pcDNA3.1 模板, Sanger 测序证实获得突变型 SOX18-pcDNA3.1。培养及表达质粒的共转染方法见参考文献 [6]。转染质粒后 48 h 收集、裂解 HeLa 细胞。应用双荧光素酶 (双报告基因) 分析系统 (美国 Promega 公司) 在荧光分析仪 (美国 Promega 公司) 上定量分析荧光素酶活性 (荧光强度)。以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的活性比值 (比活性) 表示靶基因 NR2F2 启动子的转录活性 [6]。

### 1.3 统计学分析

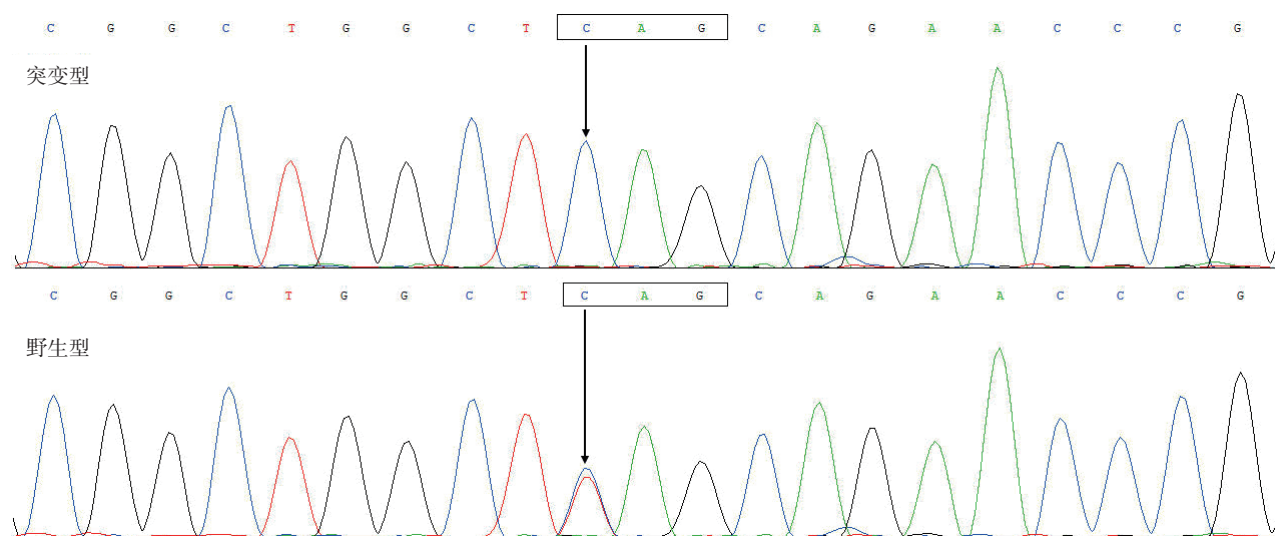
2 组连续变量参数如入选者的年龄、靶基因 NR2F2 启动子的转录活性等的比较使用 Student's *t* 检验; 2 组分类变量参数如入选者的性别、种族等的比较使用 Pearson's  $\chi^2$  检验。以双侧检验值

$P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 发现 SOX18 基因致病新突变

本研究中入选先天性散发性 PDA 病例组 ( $n=134$ ) 和健康对照组 ( $n=202$ ) 均为中国汉族, 2 组间性别构成差异无统计学意义 (经 Pearson's  $\chi^2$  检验  $P > 0.05$ ), 年龄差异也无统计学意义 (经 Student's *t* 检验  $P > 0.05$ ), 均无先天性心脏病阳性家族史。对 SOX18 基因进行测序分析, 在 1 例 4 岁的散发性先天性 PDA 患儿中发现了 1 个杂合无义突变, 即 NM\_018419.3:c.313C>T;p.(Gln105\*) 突变。该 SOX18 基因突变在其他 PDA 患儿和 202 名对照者中均没有检测出, 在万方数据库、PubMed 数据库、HGMD 和 SNP 数据库也均无报道, 表明该 SOX18 基因突变是新发现的突变。该例散发性先天性 PDA 患儿的 SOX18 基因 c.313C>T 杂合突变及纯合野生型对照 DNA 序列见图 1。



注: 方框内3个核苷酸构成1个氨基酸编码密码子; 箭头所指为先证者的SOX18基因c.313C>T杂合突变型C/T (突变型) 和对照者的纯合野生型C/C (野生型)

图1 SOX18基因c.313C>T杂合突变型及纯合野生型DNA序列

### 2.2 SOX18 基因新突变 c.313C>T 有致病性

SOX18 基因新突变 c.313C>T 被 Mutation Taster 2021 在线软件预测为致病性突变 (deleterious), 且该突变也不存在于 ExAC、1000G 和 gnomAD 这些群体遗传学数据库 (<https://www.genecascade.org/MT2021/MutationTaster102.cgi>), 进一步表明该 SOX18 基因突变是 1 种新突变。

### 2.3 Gln105\*-突变型 SOX18 对靶基因 NR2F2 的转录激活功能丧失

在转染了多种基因表达质粒的 HeLa 细胞中, 0.6  $\mu$ g 的野生型 SOX18-pcDNA3.1 表达质粒和相同剂量 (0.6  $\mu$ g) 的 Gln105\*-突变型 SOX18-pcDNA3.1 表达质粒对靶基因 NR2F2 启动子的转录激活效应分别约为 12 倍 ( $12.41 \pm 1.30$ ) 和 1 倍



( $1.11 \pm 0.52$ ), 纯合野生型与纯合突变型之间的差异有统计学意义 ( $t=14.04$ ,  $P<0.01$ ); 而在同时转染  $0.3 \mu\text{g}$  的野生型 *SOX18*-pcDNA3.1 表达质粒和相同剂量 ( $0.3 \mu\text{g}$ ) 的 *Gln105\**- 突变型 *SOX18*-pcDNA3.1 表达质粒时, 所诱导的转录激活效应约为 6 倍 ( $6.29 \pm 0.92$ ), 显著低于  $0.6 \mu\text{g}$  的野生型 *SOX18*-pcDNA3.1 表达质粒所诱导的转录激活效应 (约 12 倍), 纯合野生型与杂合突变型之间的差异有统计学意义 ( $t=6.67$ ,  $P<0.01$ )。

### 3 讨论

本研究在 1 例先天性散发性 PDA 患儿发现了新的 *SOX18* 基因杂合无义突变即 NM\_018419.3:c.313C>T;p. (Gln105\*) 突变。Mutation Taster 2021 软件模拟分析显示该 *SOX18* 基因突变有致病性。双报告基因定量分析表明 *Gln105\**- 突变型 *SOX18* 对靶基因 *NR2F2* 启动子的转录激活效应丧失。这些研究结果表明, *SOX18* 基因新突变 c.313C>T 即 p. (Gln105\*) 很可能是该例散发性先天性 PDA 患者的分子病因。

*SOX18* 基因定位于人类 20 号染色体 20q13.33, 编码 1 种由 384 个氨基酸残基组成的转录因子, 属于 SOX 家族转录因子成员<sup>[6]</sup>。人类 *SOX18* 蛋白有 2 个关键结构域, 即转录激活结构域 (TAD) 和高移动基团结构域 (HMG)。位于 N 端的 HMG 负责与靶基因启动子区域中一致的 SOX 结合 DNA 序列 (A/T)(A/T)CAA(A/T)G (核心序列是 AACAA TG) 特异性地结合; 而位于 C 端的 TAD 负责转录激活靶基因, 也可与转录合作伙伴结合一起协同转录激活靶基因的表达<sup>[8-9]</sup>。在胚胎发育期间, *SOX18* 大量表达于心脏和血管, 对胎儿心血管的正常发育具有关键调控作用, 可能通过单独或与其转录合作伙伴 *NKX2.5* 和 *MEF2C* 协同调节对心血管发育具有重要作用的靶基因, 如 *NR2F2* 和 *GATA4* 的表达<sup>[8-13]</sup>。此外, 已经发现 *NR2F2*、*GATA4*、*NKX2.5* 和 *MEF2C* 基因功能缺失性突变均可导致先天性心脏病甚至 PDA<sup>[5-6,14]</sup>。本研究所发现的错义突变预计会产生 1 种截短的 *SOX18* 蛋白, 缺失了 TAD 结构域和部分 MHG 结构域, 推测会导致功能异常。生化分析证实 *Gln105\**- 突变型 *SOX18* 对靶基因 *NR2F2* 的转录激活功能丧失。这些研究结果表明 *SOX18* 基因单倍型不足是人类 PDA 的分子病理机制之一。

在脊椎动物中, 目前已经克隆了至少 20 种

*SOX* 基因, 这些基因被分成 10 组 (从 A 到 I), 其中 *SOX18*、*SOX7* 和 *SOX17* 基因属于 *SOX* 基因族中的 F 组 (SoxF)。既往研究表明, SoxF 成员共同表达于心血管系统, 在心血管发育期间调节细胞的特化与组织分化<sup>[15]</sup>。*SOX18* 基因缺陷导致先天性心脏病可能与其所致的心血管异常发育有关。在人以及一些动物如小鼠、蟾蜍和斑马鱼中, *SOX18* 在胚胎发育期大量表达于心脏和血管, 在心血管正常发育方面发挥重要作用, 主要调节内皮细胞和心脏起源的中胚层的特化和分化<sup>[8,11,15-16]</sup>。在蟾蜍中, *Sox18* 或 *Sox7* 基因单独沉默均可导致心脏发育被部分抑制, 而 *Sox18* 和 *Sox7* 基因同时沉默则可导致心脏发育被强烈抑制<sup>[16]</sup>。*Sox18* mRNA 可以减轻 *Sox7* 基因沉默的心脏发育抑制效应, 反之亦然, 表明 *Sox18* 和 *Sox7* 基因功能上相互代偿<sup>[16]</sup>。在斑马鱼, *Sox18* 或 *Sox7* 基因单独沉默仅导致轻微的血管畸形, 而 *Sox18* 和 *Sox7* 双基因同时沉默则可导致严重的动静脉畸形而且完全外显<sup>[8]</sup>。在小鼠中, *Sox17* 基因敲除可导致胎心环化异常、大静脉扩张和动脉畸形, 而 *Sox18* 和 *Sox17* 双基因敲除则可导致更加严重的动、静脉和微血管畸形以及心内膜细胞分化异常; 在过表达 1 种显性抑制性突变型 *SOX18* 的小鼠中, 发生了心血管发育异常所致的出血、水肿和胚胎死亡; 单独敲除 *Sox18* 基因的小鼠无明显心血管发育畸形, 可能主要由于 *Sox7* 和 *Sox17* 有代偿作用<sup>[15]</sup>。在人类中, *SOX18*、*SOX7* 和 *SOX17* 这 3 个基因的功能丧失性突变均被发现可导致先天性心脏病甚至 PDA<sup>[6,10,17]</sup>。另外, *TFAP2B* 基因突变可导致综合征型 PDA, 主要机制是通过干扰 *TFAP2B* 对经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制<sup>[18]</sup>。小鼠、蟾蜍和人的 SoxF 组转录因子的 C 端均有保守的  $\beta$ -catenin 结合域并且可与  $\beta$ -catenin 相互作用, 抑制  $\beta$ -catenin/TCF 转录复合物的活性, 进而抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号<sup>[8]</sup>。本研究所发现的 *SOX18* 基因突变很可能通过相似的机制导致 PDA。

值得注意的是, *SOX18* 基因突变与人类疾病的关系已有报道。Shi 等<sup>[6]</sup>对 1 个 PDA 家系 (部分 PDA 患者合并有肺动脉狭窄, 全部患者均合并毛细血管扩张) 进行测序分析, 发现了 *SOX18* 基因新突变 NM\_018419.3: c.349A>T; p. (Lys117\*), 功能研究表明 *Lys117\**- 突变型 *SOX18* 对靶基因 *NR2F2* 和 *GATA4* 的转录激活作用丧失。此外, *SOX18*

基因突变还可导致主动脉扩张、肺动脉高压及毛细血管扩张 - 淋巴水肿 - 毛发稀少综合征等<sup>[19]</sup>。本研究发现 *SOX18* 基因新的突变导致 PDA, 扩大了疾病相关 *SOX18* 基因的突变谱。

总之,本研究识别出 1 种新的 *SOX18* 基因功能缺失性突变,该突变可导致先天性 PDA,这不仅揭示了 PDA 新的分子病理机制,对 PDA 的精准医学防治也有潜在的临床意义。

### 参 考 文 献

- [1] Gao Y, Wu D, Chen B, et al. Rare variants in novel candidate genes associated with nonsyndromic patent ductus arteriosus identified with whole-exome sequencing[J]. *Front Genet*, 2022, 13:921925.
- [2] Ke ZP, Zhang GF, Guo YH, et al. A novel *PRRX1* loss-of-function variation contributing to familial atrial fibrillation and congenital patent ductus arteriosus[J]. *Genet Mol Biol*, 2022, 45(2):e20210378.
- [3] 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.
- [4] Ma L, Wang J, Li L, et al. *ISL1* loss-of-function mutation contributes to congenital heart defects[J]. *Heart Vessels*, 2019, 34(4):658-668.
- [5] Qiao XH, Wang F, Zhang XL, et al. *MEF2C* loss-of-function mutation contributes to congenital heart defects[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(11):1143-1153.
- [6] Shi HY, Xie MS, Yang CX, et al. Identification of *SOX18* as a new gene predisposing to congenital heart disease[J]. *Diagnostics*, 2022, 12(8):1917.
- [7] 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.
- [8] Lilly AJ, Lacaud G, Kouskoff V. *SOXF* transcription factors in cardiovascular development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63:50-57.
- [9] Wangberg H, Wigby K, Jones MC. A novel autosomal dominant mutation in *SOX18* resulting in a fatal case of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(12):2824-2828.
- [10] Huang RT, Guo YH, Yang CX, et al. *SOX7* loss-of-function variation as a cause of familial congenital heart disease[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(3):1672-1684.
- [11] Azuma T, Seki N, Yoshikawa T, et al. cDNA cloning, tissue expression, and chromosome mapping of human homolog of *SOX18*[J]. *J Hum Genet*, 2000, 45(3):192-195.
- [12] Swift MR, Pham VN, Castranova D, et al. *SoxF* factors and Notch regulate *nr2f2* gene expression during venous differentiation in zebrafish[J]. *Dev Biol*, 2014, 390(2):116-125.
- [13] Hosking BM, Wang SC, Chen SL, et al. *SOX18* directly interacts with *MEF2C* in endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(2):493-500.
- [14] Peng T, Wang L, Zhou SF, et al. Mutations of the *GATA4* and *NKX2.5* genes in Chinese pediatric patients with non-familial congenital heart disease[J]. *Genetica*, 2010, 138(11/12):1231-1240.
- [15] Sakamoto Y, Hara K, Kanai-Azuma M, et al. Redundant roles of *Sox17* and *Sox18* in early cardiovascular development of mouse embryos[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(3):539-544.
- [16] Zhang C, Basta T, Klymkowsky MW. *SOX7* and *SOX18* are essential for cardiogenesis in *Xenopus*[J]. *Dev Dyn*, 2005, 234(4):878-891.
- [17] Zhao L, Jiang WF, Yang CX, et al. *SOX17* loss-of-function variation underlying familial congenital heart disease[J]. *Eur J Med Genet*, 2021, 64(5):104211.
- [18] Hu L, Chen L, Yang L, et al. *KCTD1* mutants in scalp-ear-nipple syndrome and AP-2 $\alpha$  P59A in Char syndrome reciprocally abrogate their interactions, but can regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5):3895-3903.
- [19] Coulie R, Niyazov DM, Gambello MJ, et al. Hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia syndrome: report of ileal atresia associated with a *SOX18* de novo pathogenic variant and review of the phenotypic spectrum[J]. *Am J Med Genet A*, 2021, 185(7):2153-2159.

(收稿:2022-11-13 修回:2023-08-04)

(本文编辑:丁媛媛)