

孤立性房颤相关 SCN4B 基因突变谱分析

王倩 徐蕾 杨奕清

【摘要】 目的:发现孤立性房颤相关 SCN4B 基因新突变。 方法:收集 160 例孤立性房颤患者和 200 名健康对照者的临床资料和血标本,抽提基因组 DNA。通过聚合酶链反应扩增房颤候选基因 SCN4B 的编码区和剪接位点,采用双脱氧核苷链末端合成终止法测序以发现 SCN4B 基因突变。应用 ClustalW 软件评估突变氨基酸的保守性,应用 MutationTaster 软件预测突变的致病性。 结果:在 2 例孤立性房颤患者各发现 1 个新的 SCN4B 基因杂合错义突变,突变率为 1.25%。其中 1 个是 SCN4B 基因编码核苷酸序列第 409 位的腺嘌呤(adenine, A)变为鸟嘌呤(guanine, G),即 c.409A>G 突变;另一个是 SCN4B 基因编码核苷酸序列第 511 位的 G 变为 A,即 c.511G>A 突变。多序列比对显示 2 种突变氨基酸在进化上均高度保守。致病性预测表明 2 种突变均有致病性。结论:本研究发现孤立性房颤相关 SCN4B 基因新突变,有助于揭示房颤新的分子机制。

【关键词】 房颤;遗传学;离子通道;SCN4B

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.06.019

Spectrum of SCN4B mutations associated with lone atrial fibrillation WANG Qian, XU Lei, YANG Yi-Qing. *Departments of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, Central Labaratory, Shanghai Chest Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China*

【Abstract】 Objective: To identify novel SCN4B mutations associated with lone atrial fibrillation (AF). **Methods:** Clinical data and blood samples were collected from 160 unrelated patients with lone AF and 200 unrelated, ethnically matched healthy individuals as controls. The genomic DNA from the participants was extracted. The coding regions and splice junction sites of the candidate gene SCN4B were amplified by polymerase chain reaction and then sequenced with di-deoxynucleotide chain termination technique. The sequence variations were identified by alignment of the acquired sequences with those of SCN4B from GenBank. The software ClustalW for alignment of multiple sequences was used to demonstrate whether an altered amino acid is evolutionarily conserved. The software MutationTaster was used to predict the causative potential of a mutation. **Results:** Two novel heterozygous missense mutations of SCN4B were identified in 2 lone AF patients respectively, with a mutational prevalence of 1.25%. One is the substitution of guanine (G) for adenine (A) at coding nucleotide 409 of SCN4B (c.409A>G); the other is the transition of G into A at the first nucleotide of codon 171 (c.511G>A). Multiple alignments of SCN4B proteins across species showed that the altered amino acids were highly conserved evolutionarily. The 2 mutations were both automatically predicted to be disease-causing. **Conclusion:** This study firstly links SCN4B mutations to lone AF, providing novel insight into the molecular mechanism involved in the pathogenesis of AF.

【Key words】 Atrial fibrillation; Genetics; Ion channel; SCN4B

基金项目:国家自然科学基金(81070153, 81270161, 30570768)

作者单位:200030 上海交通大学医学院附属胸科医院心内科、心血管研究室、中心实验室

通信作者:杨奕清, Email: dryyq@tongji.edu.cn

近年来的研究发现,心脏钠通道在心脏电生理方面具有重要作用,其 α 亚单位和 4 个 β 亚单位中的 3 个即 SCN1B、SCN2B 和 SCN3B 突变均可导致房颤^[1-5]。因此,有理由假设第 4 个心脏钠通道 β 亚单位 SCN4B 基因突变也可能导致房颤。为证实此假说,本研究首先对比分析孤立性房颤患者的 SCN4B 基因突变谱。

1 对象和方法

1.1 研究对象

本研究对象选自 2010 年 1 月至 2012 年 6 月期间在上海交通大学附属胸科医院就诊的房颤患者。入选标准:(1)房颤发作持续时间>30 s;(2)有记录房颤发作的常规 12 导联体表心电图或动态心电图证据;(3)患者知情同意。排除标准:(1)有房颤发作时的症状如心悸、胸闷,但无心电图证据;(2)经过详细体检、实验室检查、心脏超声检查等发现有器质性心血管疾病或代谢性疾病等房颤危险因素;

表 1 扩增 SCN4B 基因目的片段的引物序列

外显子	正向引物 (5'至 3')	反向引物 (5'至 3')	大小 (bp)
1	CTC, TCT, GCC, CGC, TAA, CTT, TC	CTA, TGA, ACC, AGG, CAG, GAA, CC	371
2	TTG, GCA, CTG, AGG, GTG, ATA, GA	CAG, AAG, GGA, CCA, GAG, CGT, AG	372
3	GAG, GAC, CCC, GAT, TCT, TTC, TC	AAA, CAC, CAA, CAC, GGT, CCA, TT	387
4	TGA, TAG, ATG, CCA, TGC, TCT, GC	GGG, GTA, GAT, GAG, AGG, GTG, GT	382
5	TCT, GTA, GAA, GGC, CAG, GGA, GA	GGC, AGG, ACT, CTG, GTT, TCT, TG	361

1.2.3 SCN4B 基因目的片段的扩增 以基因组 DNA 为模板,使用 HotStar Taq DNA 聚合酶等聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂(Qiagen 公司),分别使用 5 对引物在 Veriti 型 PCR 仪(Applied Biosystems 公司)上扩增目的基因片段。PCR 的反应体系为 25 μ l,其中 10 \times 缓冲液 2.5 μ l,5 \times Q 液 5 μ l,dNTP(2.5 mmol/L)2 μ l,基因组 DNA (100 ng/ μ l) 1 μ l,上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ l,双蒸水 13.25 μ l,HotStar Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ l)0.25 μ l。反应参数如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min,继之 35 个循环,每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,终末 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后割胶回收所需基因片段,并使用凝胶回收试剂盒(Qiagen 公司)进行纯化。

1.2.4 SCN4B 基因序列分析 使用 Big Dye Terminator 测序试剂盒(Applied Biosystems 公司)对纯化的 SCN4B 基因片段进行测序反应。反应体系为 10 μ l,其中预混合液 4 μ l,DNA (20 ng/ μ l)

(3)初次发病年龄>60 岁。在自同期来院进行健康体检的人中选择年龄、性别和种族匹配者作为研究对照。本研究符合医学伦理学规范,得到医院医学伦理委员会的批准。经入选者知情同意后取外周静脉血 3 ml,置于含有 0.5 ml 抗凝剂 ACD 的试管中,混匀后 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备使用基因组 DNA 纯化试剂盒(Promega 公司)自外周静脉血白细胞抽提基因组 DNA。

1.2.2 扩增 SCN4B 基因目的片段的引物设计与合成登陆美国生物信息中心网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),进入核苷酸数据库,下载 SCN4B 基因组序列(序列号:NG_011710),借助在线程序 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>),设计出扩增 SCN4B 基因目的片段的 5 对引物,由上海生物工程公司合成,引物序列见表 1。

3 μ l,引物(2 μ mol/L) 1 μ l,双蒸水 2 μ l。反应参数如下:共计 30 个循环,每个循环 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,50 $^{\circ}$ C 退火 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。测序反应产物经纯化后,使用 3130XL 型自动荧光测序仪(Applied Biosystems 公司)测序。使用 DNA 序列分析软件(Applied Biosystems 公司)分析测序结果并将所测序列与 GenBank 中的已知序列(登陆号:NM_174934.3)进行比对以识别基因变异。一旦发现新的 SCN4B 基因变异,则以正常对照者的基因组 DNA 为模板,使用上述引物进行 PCR-测序,并对比分析房颤患者与正常对照者的 SCN4B 基因序列。

1.2.5 突变氨基酸的保守性分析 登陆 GenBank 数据库,获取人、大猩猩、猴、狗、牛、小鼠、大鼠、禽、斑马鱼等物种 SCN4B 基因编码的氨基酸序列,使用 ClustalW 软件对比分析突变氨基酸的保守性。

1.2.6 SCN4B 基因变异的致病性预测 利用在线软件 MutationTaster (登陆网址:<http://www.mutationtaster.org>)预测 SCN4B 基因变异的致病性,并自动给出正确预测的概率值。

1.3 统计学分析

使用 SPSS15.0 统计软件包进行统计分析。连续变量用(均数±标准差)表示,两组计量资料的比较使用非配对 Student's *t* 检验,计数资料的比较使用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率计算,以双侧统计量值 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床特点

本研究入选 160 例无血缘关系的汉族孤立性房颤患者(病例组)和 200 名无血缘关系的汉族健康人(对照组)。病例组男 94 例,女 66 例,平均年龄(52.83 ± 6.51)岁,家族史阳性 9 例。对照组男 115 例,女 85 例,平均年龄(53.11 ± 5.28)岁,均无阳性家族史。两组间年龄、性别比例、体重指数、血压、血糖、血脂和左室射血分数均无显著性差异(双侧 P 值均 > 0.05),但病例组房颤阳性家族史的比例显著高于对照组(精确概率计算得 $P < 0.0001$),其左心房内径也显著大于对照组, (38.45 ± 3.18) mm 对 (36.24 ± 4.05) mm, $P < 0.0001$ 。

2.2 识别 SCN4B 基因的新突变

在 2 例家族史阴性的孤立性房颤患者各发现 1 个新的 SCN4B 基因杂合错义突变,突变率为 1.25%。1 例为女性 56 岁阵发性房颤患者,其 SCN4B 基因编

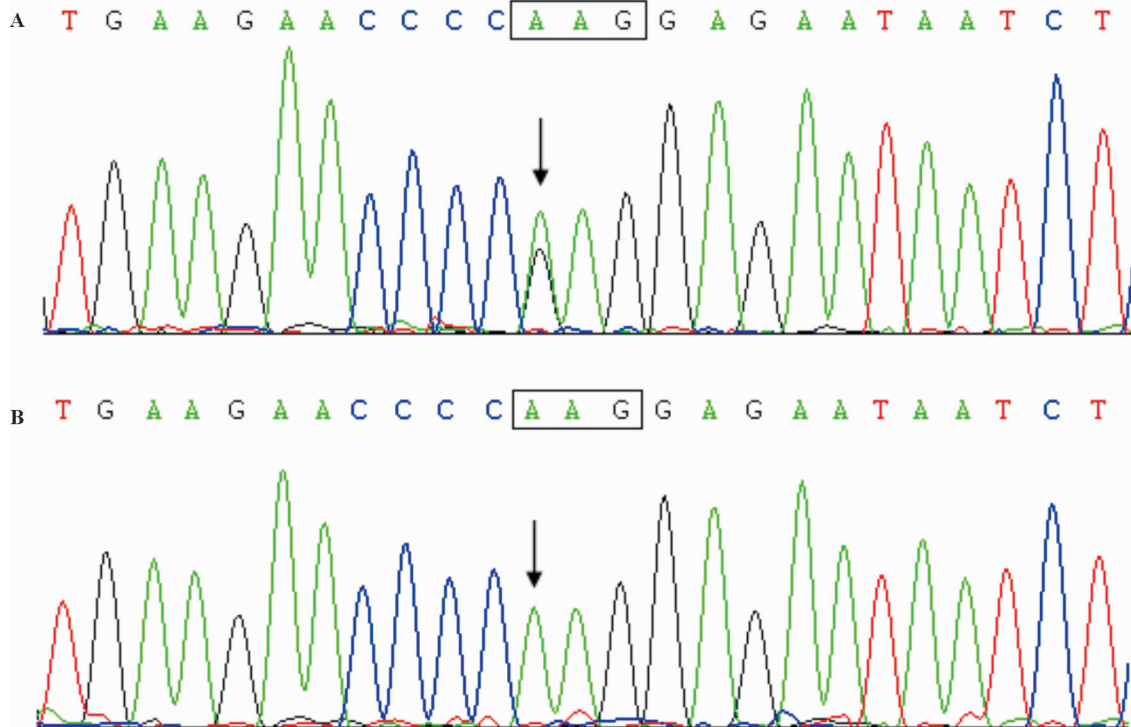
码核苷酸序列第 409 位的腺嘌呤(adenine, A)变为鸟嘌呤(guanine, G),即 c. 409A $>$ G 突变,相当于 SCN4B 基因编码氨基酸序列之第 137 位的赖氨酸(lysine, K)变为谷氨酸(glutamic acid, E),亦即 p. K137E 突变;另 1 例为女性 44 岁阵发性房颤患者,其 SCN4B 基因编码核苷酸序列第 511 位的 G 变为 A,即 c. 511G $>$ A 突变,相当于氨基酸序列之第 171 位的甘氨酸(glycine, G)变为丝氨酸(serine, S),亦即 p. G171S 突变。经联合检索美国的 PubMed 和 SNP 数据库以及我国的万方数据库,本研究所发现的突变均未见报道,提示为新突变。c. 409A $>$ G 和 c. 511G $>$ A 杂合突变型序列及其野生型对照序列分别见图 1 和图 2。

2.3 突变氨基酸在进化上高度保守

多物种 SCN4B 基因编码氨基酸序列比对显示,第 137 位的赖氨酸和第 171 位的甘氨酸在进化上完全保守,多序列比对结果见图 3。

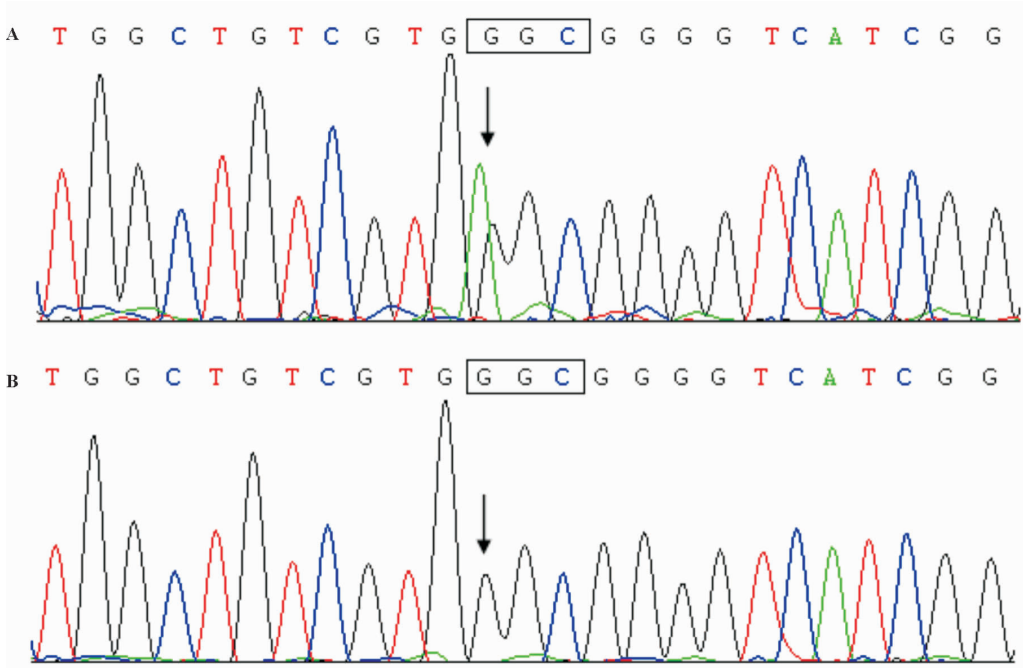
2.4 SCN4B 基因变异具有致病性

在线软件预测结果显示,SCN4B 基因 c. 409A $>$ G 和 c. 511G $>$ A 变异均为致病性突变,预测正确的概率值分别为 0.998318 和 0.999656。另外,在 MutationTaster 数据库中,没有发现本研究所识别出的这两个突变,进一步提示其为新突变。



注:箭头所示分别为 SCN4B 基因 c. 409A $>$ G 突变型杂合子序列 A/G 和野生型纯合子序列 A/A

图 1 SCN4B 基因 c. 409A $>$ G 杂合突变及其对照序列



注:箭头所示分别为 SCN4B 基因 c. 511G>A 突变型杂合子序列 G/A 和野生型纯合子序列 G/G

图 2 SCN4B 基因 c. 511G>A 杂合突变及其对照序列

		K137E	
		115	153
NP_777594.1	(人)	SIVLRDLEFSDTGKYTCHVKNP	K ENNLQHHAT IFLQVVD
XP_001159939.1	(大猩猩)	SIVLRDLEFSDTGKYTCHVKNP	K ENNLQHHAT IFLQVVD
XP_002799948.1	(猴)	SIVLRDLEFSDTGKYTCHVKNP	K ENNLQHHAT IFLQVVD
XP_003434624.2	(狗)	SILLRNLEFSDTGKYTCHVQNP	K ENNFRHQAT IFLQVVD
NP_001070380.1	(牛)	SISLKNLEFSDTGKYTCHVKNP	K ENDFQHQAT IFLQVVD
NP_001013408.1	(小鼠)	SILLSDLEFSDTGRYTCFVRNP	K EKDLNNSAT IFLQVVD
NP_001008880.1	(大鼠)	SILLSDLEFSDTGRYTCFVRNP	K EKDLNNSAT IFLQVVD
XP_417913.2	(禽)	SIVLKDVELSDAGRYTCHVLNP	K EKK-AHNAT IFLTVDH
NP_001071041.1	(斑马鱼)	SILLWNVTFEDAGVYTCFGKNP	K EKGRNHSAF FTLYVVE
NP_001071038.1	(斑马鱼)	SILLHNVTTFEDQGEYICFARNP	K EKDRNHSAV FTLYVVD
		G171S	
		154	192
NP_777594.1	(人)	RLEEVDNTVTTLI ILAVV	G GVIGLLILILLIKLII FILK
XP_001159939.1	(大猩猩)	RLEEVDNTVTTLI ILAVV	G GVIGLLILILLIKLII FILK
XP_002799948.1	(猴)	RRMQ-----	- -----
XP_003434624.2	(狗)	KLEEVDNTVTTLI ILGVV	C GVIGLLIFILLVKKVIAFIIK
NP_001070380.1	(牛)	KLEEVDNTVTTLI ILGVV	G GVIGLLIFILLVKKFIAFIIK
NP_001013408.1	(小鼠)	KLEKVDNTVTTLI ILAVV	G GVIGLLVCILLKKLITFILK
NP_001008880.1	(大鼠)	KLEEVDNTVTTLI ILAVV	G GVIGLLVCILLKKLITFILK
XP_417913.2	(禽)	KLEETDNTVTTLI IVGVV	G GLIGLLILFMLVKRVVLFIIK
NP_001071041.1	(斑马鱼)	ELKVVDNTLTII IASCV	G GFIAFIMTFMLLKNLTLFILA
NP_001071038.1	(斑马鱼)	ELRVVDNTLTTLI IVSVL	G GVIGLIILIMVVKAVVIAVLN

注:箭头所示分别为第 137 位的赖氨酸和第 171 位的甘氨酸

图 3 多物种 SCN4B 基因编码氨基酸序列比对结果

3 讨论

本研究发现了 2 个新的 SCN4B 基因突变 p. K137E 和 p. G171S。这 2 个突变均不存在于 200 名健康对照者中,而且所改变的氨基酸在进化上均完全保守,计算机功能模拟显示两个突变均具有致病性。因此,这两个 SCN4B 基因突变很可能是导致携带者发生房颤的分子病因。

人类 SCN4B 基因定位于染色体 11q23.3,有 5 个外显子,编码 228 个氨基酸,构成钠离子通道的第 4 型辅助亚单位 β_4 。定量表达分析显示 β_4 主要表达于可兴奋组织,如神经、骨骼肌和心肌组织^[6,7]。与 β_1 、 β_2 和 β_3 类似, β_4 在功能结构域上也包括 1 个 N 端切除信号序列(氨基酸 1-30)、1 个胞外 5 型免疫球蛋白样折叠(氨基酸 31-161)、1 个跨膜 α 螺旋(氨基酸 162-183)和 1 个可能参与蛋白间相互作用的短胞内 C 末端(氨基酸 184-228)。在成熟 β_4 蛋白的 5 型免疫球蛋白样折叠结构域,有 3 个胱氨酸,其中第 23 位和第 101 位的胱氨酸可能形成分子内二硫键以稳定胞外结构域。 β_4 亚单位与 α 亚单位通过二硫键共价结合,形成功能性钠通道复合物。 β_4 亚单位的生理功能主要是增加钠通道在细胞表面上的表达,并调节钠通道的门控动力学和电压依赖性,因此对心脏电生理具有重要影响^[8]。本研究所发现的 2 个 β_4 突变 p. K137E 和 p. G171S 分别位于 β_4 蛋白的 5 型免疫球蛋白样折叠结构域和跨膜 α 螺旋结构域,有可能通过影响钠通道的表达及其电生理特性而诱发房颤,其确切的致病作用机制仍有待进一步研究。

SCN4B 基因突变的致房颤作用主要与钠通道功能异常有关。钠通道不仅与动作电位的产生有关,而且还与峰电位的维持有关,钠通道功能障碍可导致有效不应期缩短、动作电位的传导速度减慢,形成有利于房颤的电生理基质^[9]。另外,钠通道功能增强可导致细胞的兴奋性升高,自动化除极速度增加,动作电位的阈值降低,也形成有利于房颤的电生理基质^[10-12]。

总之,本研究识别出孤立性房颤相关 SCN4B 基因新突变,揭示了房颤新的分子病因,有助于房颤的早期预防和个体化治疗。

参 考 文 献

- [1] Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, et al. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2008, 117(15): 1927-1935.
- [2] Watanabe H, Darbar D, Kaiser DW, et al. Mutations in sodium channel β_1 - and β_2 -subunits associated with atrial fibrillation [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2009, 2(3): 268-275.
- [3] Olesen MS, Holst AG, Svendsen JH, et al. SCN1Bb R214Q found in 3 patients: 1 with Brugada syndrome and 2 with lone atrial fibrillation [J]. *Heart Rhythm*, 2012, 9(5): 770-773.
- [4] Wang P, Yang Q, Wu X, et al. Functional dominant-negative mutation of sodium channel subunit gene SCN3B associated with atrial fibrillation in a Chinese GeneID population [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(1): 98-104.
- [5] Olesen MS, Jespersen T, Nielsen JB, et al. Mutations in sodium channel β -subunit SCN3B are associated with early-onset lone atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(4): 786-793.
- [6] Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, et al. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2 [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (20): 7577-7585.
- [7] Maier SK, Westenbroek RE, McCormick KA, et al. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart [J]. *Circulation*, 2004, 109(11): 1421-1427.
- [8] Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(3): 448-458.
- [9] Terrenoire C, Simhaee D, Kass RS. Role of sodium channels in propagation in heart muscle: how subtle genetic alterations result in major arrhythmic disorders [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2007, 18(8): 900-905.
- [10] Makiyama T, Akao M, Shizuta S, et al. A novel SCN5A gain-of-function mutation M1875T associated with familial atrial fibrillation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(16): 1326-1334.
- [11] Li Q, Huang H, Liu G, et al. Gain-of-function mutation of Nav1.5 in atrial fibrillation enhances cellular excitability and lowers the threshold for action potential firing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(1): 132-137.
- [12] Blana A, Kaese S, Fortmüller L, et al. Knock-in gain-of-function sodium channel mutation prolongs atrial action potentials and alters atrial vulnerability [J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(12): 1862-1869.

(收稿:2013-03-26 修回:2013-07-14)

(本文编辑:丁媛媛)