

先天性心脏缺损相关 NR2F2 基因新突变研究

董斌斌 刘兴元 杨奕清

【摘要】 目的:探索先天性心脏缺损(CHD)相关 NR2F2 基因新突变。 方法:入选 104 例中国汉族 CHD 患者和 208 名匹配的非 CHD 对照者。对全部入选对象的 NR2F2 基因的编码区、剪接位点及部分非翻译区进行聚合酶链反应-测序分析。将所测序列与核苷酸数据库中公布的 NR2F2 序列进行对比分析以发现 NR2F2 基因突变。运用计算机软件 ClustalW2 分析突变氨基酸进化上的保守性,应用 PROVEAN、MutationTaster 和 PolyPhen-2 软件预测突变的致病性。 结果:在 1 例散发性动脉导管未闭合并室间隔缺损患者中发现了 1 个 NR2F2 基因新突变,即 c. 1189C>T(p. Arg397Trp)突变。该错义突变不存在于 208 名非 CHD 对照者。多物种 NR2F2 蛋白的氨基酸序列比对分析显示被改变氨基酸在进化上完全保守,致病性预测表明所识别的 NR2F2 基因突变是致病性突变。 结论:c. 1189C>T 是 CHD 相关 NR2F2 基因新突变,对 CHD 的早期防治具有潜在的意义。

【关键词】 先天性心脏缺损;分子遗传学;转录因子;NR2F2;突变

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.04.013

Investigation of a new NR2F2 mutation responsible for congenital heart defect DONG Binbin¹, LIU Xingyuan², YANG Yiqing³. 1. Department of Pediatrics, North Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 201907; 2. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065; 3. Department of Cardiovascular Research, the Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China

【Abstract】 Objective: To investigate a new NR2F2 mutation involved in the pathogenesis of congenital heart defect (CHD). **Methods:** One hundred and four unrelated patients of Han nationality with CHD and 208 non-CHD control subjects were recruited. The coding regions, splicing sites and partial untranslated regions of the NR2F2 gene were analyzed by polymerase chain reaction-sequencing in all participants. To identify a novel NR2F2 mutation, comparison analysis between the obtained sequences and NR2F2 sequences from the Nucleotide database was done. The computer software of ClustalW2 was used to analyze whether the mutated amino acid was evolutionarily conserved. The disease-causing potential of the detected NR2F2 mutation was predicted by PROVEAN, MutationTaster and PolyPhen-2. **Results:** A new heterozygous NR2F2 mutation c. 1189C > T, equivalent to p. Arg397Trp, was discovered in a patient with sporadic patent ductus arteriosus and ventricular septal defect. The missense mutation was absent from the 208 control individuals. The altered amino acid was completely conserved evolutionarily, and the missense mutation was predicted to be pathogenic. **Conclusions:** c. 1189C > T is a new NR2F2 mutation with potential clinical implications for the early prophylaxis and treatment of CHD.

【Key words】 Congenital heart defect; Molecular genetics; Transcriptional factor; NR2F2; Mutation

基金项目:国家自然科学基金项目(81470372);上海市自然科学基金项目(16ZR1432500)

作者单位:201907 上海,复旦大学附属华山医院北院儿科(董斌斌);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血管研究室(杨奕清)

通信作者:刘兴元,Email:liuxingyuan402@163.com

先天性心脏缺损(CHD)是人类最多见的出生畸形,在新生儿中的发病率为 1%左右,约占全部出生畸形的 1/3^[1]。严重 CHD 可导致神经发育障碍或脑损伤、血栓栓塞、肺动脉高压、细菌性肺炎或心内膜炎、心功能不良或心力衰竭、房性或室性心律失常和心源性猝死等^[1-3]。流行病学及医学遗传学研究发现 CHD 主要与遗传缺陷有关,在已经发现的 60 多个 CHD 致病基因中,大部分基因编码心脏转录因子^[4]。最近的研究发现,心脏转录因子基因 NR2F2 突变可导致单纯型及综合征型 CHD^[5-8]。由于 CHD 具有显著的临床及遗传异质性^[4],有必要在不同 CHD 人群中研究 NR2F2 基因与 CHD 的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

自 2015 年 4 月至 2017 年 12 月入选了 104 例 CHD 患者和 208 名匹配的非 CHD 对照者,均来自中国上海地区汉族人群,均经询问病史及家族史、体格检查、常规化验检查和心脏彩色多普勒超声检查。在 104 例 CHD 患者中,男性 61 例,女性 43 例,年龄为 1~12 岁,平均年龄 4 岁,有阳性家族史者 12 例;在 208 名非 CHD 对照者中,男性 122 例,女性 86 例,年龄为 1~11 岁,平均年龄 4 岁,均无 CHD 患者家族史。经患者监护人知情同意后,收集患者外周静脉血约 1 mL,使用血液 DNA 分离试剂盒(中国 Sangon 公司)提取基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 NR2F2 基因扩增 扩增 NR2F2 基因编码区、剪接点及部分 5'和 3'端非翻译区所用的特异性引物序列见参考文献^[6]。以基因组 DNA 为模板,使用热启动 Taq DNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司)和 NR2F2 基因扩增引物等试剂在 PTC-220 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)上通过聚合酶链反应(PCR)扩增 NR2F2 基因片段。每一 PCR 反应物的总体积是 50 μ L,包括 dNTP(各 2.5 mmol/L)4 μ L、10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、基因组 DNA(100 ng/ μ L)2 μ L、上游引物(20 μ mol/L)1 μ L、下游引物(20 μ mol/L)1 μ L、热启动 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L 和双蒸水 36.5 μ L。PCR 条件参考试剂说明书设定如下:共 35 个循环,每一循环包括 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、62 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。PCR 扩增的目的基因片段经过 1.2%琼脂糖凝胶电泳分离、回收后用凝胶纯化试剂盒(中国 Sangon 公司)纯化。

1.2.2 NR2F2 基因测序分析 以上述纯化的目的基因片段为模板,使用正向或反向 NR2F2 基因特

异性扩增引物和 DNA 循环测序试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)在 ProFlex 型 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)上进行测序反应。测序 PCR 混合物的总体积为 20 μ L,其中纯化的 DNA 片段(20 ng/ μ L)4 μ L、预混合液 8 μ L、上游或下游引物(2 μ mol/L)1 μ L、双蒸水 7 μ L。测序 PCR 的条件设置依据试剂说明书:共 30 个循环,每一循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s、50 $^{\circ}$ C 退火 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。测序 PCR 产物经过纯化后在 3730 XL 型 DNA 测序仪(美国 Thermo Fisher 公司)上进行测序。将所测出的 NR2F2 序列与 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 NR2F2 序列(登陆号:NM_021005.3)进行对比分析以发现 NR2F2 基因变异。一旦发现 NR2F2 基因变异,就检索中外各数据库(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>、<http://gnomad.broadinstitute.org>、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>、<http://librarian.wanfangdata.com.cn>)以确定所发现的基因变异是否有过报道。

1.2.3 突变位点氨基酸的保守性分析 通过 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)下载所有可获得物种的 NR2F2 蛋白之氨基酸序列,借助在线软件 ClustalW2(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)评估突变氨基酸在物种进化上是否保守。

1.2.4 NR2F2 基因变异的致病性分析 使用在线软件 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>)、PolyPhen-2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)和 PROVEAN(<http://provean.jcvi.org>)分析所检测出的 NR2F2 基因变异是否具有致病性。

1.3 统计学分析

连续变量以均数 \pm 标准差表示,分类变量以个数或百分比表示。病例组与对照组间连续变量的比较使用 Student's *t* 检验;分类变量的比较使用 Pearson's χ^2 检验或 Fisher's 精确概率检验。双侧检验值 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

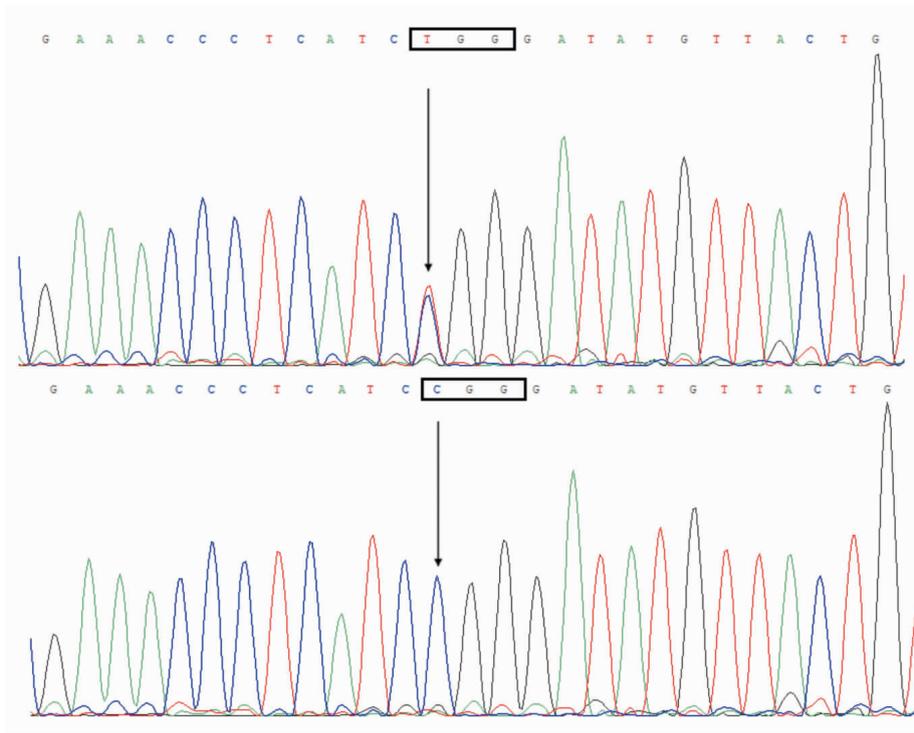
2 结果

2.1 发现 NR2F2 基因新突变

通过 PCR-测序分析 104 例 CHD 患者的 NR2F2 基因,在其中 1 例家族史阴性的动脉导管未闭合并室间隔缺损患者发现了 1 个 NR2F2 基因杂合突变,其 NR2F2 基因编码核苷酸序列第 1189 位

的胞嘧啶(C) 变为胸腺嘧啶(T),即 c. 1189C>T 突变,这导致 NR2F2 蛋白之氨基酸序列第 397 位的精氨酸(Arg)变为色氨酸(Trp),即 p. Arg397Trp 突变。该错义突变不存在于 208 名非 CHD 对照者。经过查询 HGMD、genomAD、SNP、PubMed 和万方

数据库,均无 NR2F2 基因 c. 1189C>T 变异报道,表明该 NR2F2 基因 c. 1189C>T 突变是 1 个新突变。NR2F2 基因 c. 1189C>T 杂合突变及其纯合野生型碱基序列见图 1。



注:箭头所指分别为 NR2F2 基因 c. 1189C>T 杂合突变型 T/C 和纯合野生型 C/C 序列

图 1 NR2F2 基因 c. 1189C>T 杂合突变及其纯合野生型序列

2.2 突变位点氨基酸在多物种进化上保守

NR2F2 蛋白序列与已知物种包括人、大猩猩、猴、狗、牛、小鼠、大鼠、禽、斑马鱼、果蝇、蚊虫和蟾

蜥等的 NR2F2 蛋白序列比对分析表明,第 397 位的精氨酸在多物种进化上完全保守。多物种 NR2F2 蛋白之氨基酸序列比对分析结果见图 2。

	380	Arg397Trp	414
NP_066285.1 (人)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
XP_003952785.1 (猩猩)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
XP_001099957.1 (猴)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
XP_005618373.1 (狗)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
NP_776827.1 (牛)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
NP_033827.2 (小鼠)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
NP_542856.1 (大鼠)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
NP_989752.1 (禽)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
NP_57125.1 (斑马鱼)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ
NP_524325.1 (果蝇)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGNSFSWPYLPSPM
XP_312394.4 (蚊虫)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFSWPYLPSPM
NP_001107703.1 (蟾蜍)	QLFFVRLVGKTPIETLI	R	DMLLSGSSFNWPYMAIQ

注:箭头所指为 NR2F2 蛋白之氨基酸序列第 397 位的精氨酸

图 2 跨物种 NR2F2 蛋白之氨基酸序列比对分析结果

2.3 NR2F2 基因

c. 1189C>T 突变有致病性,该 NR2F2 基因 c. 1189C>T 突变被 MutationTaster 软件预测为致

病性突变,预测结果正确的概率值约为 1.00;被 PolyPhen-2 预测为致病性突变,预测值为 1.00(敏感性为 0,特异性为 1.00);被 PROVEAN 预测为致

病性突变,预测值为 -5.68。

3 讨论

本研究在 1 例散发性动脉导管未闭合并室间隔缺损患者中识别出了 1 个新的 NR2F2 基因杂合错义突变 c.1189C>T(p. Arg397Trp),但该杂合错义突变不存在于 208 名非 CHD 对照者。该突变位点上的精氨酸在人、大猩猩、猴、狗、牛、小鼠、大鼠、禽、斑马鱼、果蝇、蚊虫和蟾蜍等物种进化上完全保守,而且在线计算机功能预测分析软件 MutationTaster, PolyPhen-2 和 PROVEAN 均预测该突变是致病性突变。因此, NR2F2 基因 c.1189C>T(p. Arg397Trp) 突变极有可能是该 CHD 患者的分子病因,但该基因突变的致 CHD 机制仍需进一步研究。

NR2F2 基因定位于人 15 号染色体 15q26.2, 编码一种由 414 个氨基酸残基所组成的转录因子蛋白,即核受体 2 亚族 F 组 2 号成员(NR2F2),也被称作鸡卵上游启动子转录因子 2(COUP-TFII)^[6]。NR2F2 对胚胎期心血管的正常发育具有重要的调控作用,主要是在胎儿心脏通过与其转录合作伙伴如 GATA4 调节多个关键基因如 ANF 的表达而实现的^[6],而 GATA4 是重要的 CHD 致病基因,已经发现越来越多的 GATA4 突变可导致 CHD^[4]。因此, NR2F2 基因突变可能通过影响 NR2F2 并与 GATA4 一起协同调节心脏发育关键靶基因的表达而导致 CHD。

NR2F2 大量表达于小鼠胚胎心脏, NR2F2 基因敲除可因心血管发育异常导致小鼠胚胎期死亡,主要表现有严重出血以及心房和静脉窦不能发育到原始血管阶段^[9]。另外,内皮特异性敲除 NR2F2 可因可导致多种心血管发育畸形,包括左房发育不良、心室发育不良、心内膜发育不良、房室间隔缺损和冠状动脉畸形^[10]。这些动物实验结果表明 NR2F2 在心血管正常发育方面有重要作用。

NR2F2 大量表达于人类胚胎心脏的心房、主动脉和冠状动脉, NR2F2 基因突变可导致室间隔缺损、房室间隔缺损、主动脉缩窄、法洛四联征、主动脉狭窄和左室发育不良综合征^[5]。Qiao 等^[6]等报道 NR2F2 基因突变导致右心室双流出道合并室间隔缺损。Bashamboo 等^[7]等报道 NR2F2 基因突变

可导致睾丸和心脏发育畸形,而 Upadia 等^[8]报道 NR2F2 基因突变可导致心脏和面部发育畸形。本研究发现, NR2F2 基因突变导致动脉导管未闭合并室间隔缺损,扩大了 NR2F2 基因相关的表型谱,进一步显示 NR2F2 缺陷的致 CHD 作用。

参 考 文 献

- [1] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67-e492.
- [2] 张小贞, 王树伟, 刘洁, 等. 婴幼儿左向右分流型先天性心脏病合并重症肺炎的体外循环管理[J]. *国际心血管病杂志*, 2018, 45(4):233-235.
- [3] 朱瑞, 张成鑫, 李鑫, 等. 202 例感染性心内膜炎患者临床特征及手术时机分析[J]. *国际心血管病杂志*, 2018, 45(6): 358-362.
- [4] 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.
- [5] Al Turki S, Manickaraj AK, Mercer CL, et al. Rare variants in NR2F2 cause congenital heart defects in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(4):574-585.
- [6] Qiao XH, Wang Q, Wang J, et al. A novel NR2F2 loss-of-function mutation predisposes to congenital heart defect[J]. *Eur J Med Genet*, 2018, 61(4):197-203.
- [7] Bashamboo A, Eozenou C, Jorgensen A, et al. Loss of function of the nuclear receptor NR2F2, encoding COUP-TF2, causes testis development and cardiac defects in 46, XX children[J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(3): 487-493.
- [8] Upadia J, Gonzales PR, Robin NH. Novel de novo pathogenic variant in the NR2F2 gene in a boy with congenital heart defect and dysmorphic features[J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(6):1423-1426.
- [9] Pereira FA, Qiu Y, Zhou G, et al. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(8):1037-1049.
- [10] Lin FJ, You LR, Yu CT, et al. Endocardial cushion morphogenesis and coronary vessel development require chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(11): e135-e146.

(收稿:2018-12-13 修回:2019-04-09)

(本文编辑:丁媛媛)