

散发性扩张型心肌病相关 ISL1 基因突变分析

乔祺 杨晨曦 顾佳宁 邱若岷 杨奕清 徐迎佳

【摘要】 目的:分析散发性扩张型心肌病(DCM)相关 ISL1 基因突变谱。 方法:收集 226 例散发性 DCM 患者和 230 名相匹配的健康人的血标本,抽提 DNA。通过聚合酶链反应-测序分析 ISL1 基因的编码外显子及侧翼内含子。对所发现的 ISL1 基因突变,应用 ClustalW2 软件评估突变氨基酸在进化上的保守性,应用在线程序 MutationTaster、PolyPhen-2 和 PROVEAN 预测突变的致病性,应用双荧光素酶报告基因分析系统评估突变的功能效应。 结果:在 1 例散发性 DCM 患者的 ISL1 基因中检测出 1 个新的杂合错义突变(c. 706G>T 即 p. Asp236Tyr),该突变不存在于对照组。跨物种 ISL1 蛋白序列比对分析表明该被改变的氨基酸在进化上完全保守,致病性预测显示该基因突变具有致病性,生化分析表明突变体对靶基因的转录激活功能显著降低。 结论:发现 1 个 ISL1 基因功能缺失性新突变,可能导致 DCM,对 DCM 的早期个体化防治具有潜在的临床意义。

【关键词】 扩张型心肌病;遗传学;转录调节;ISL1;基因突变;报告基因分析

doi:10. 3969/j. issn. 1673-6583. 2020. 03. 009

Mutation of the ISL1 gene associated with sporadic dilated cardiomyopathy QIAO Qi, YANG Chenxi, GU Jianing, DI Ruomin, YANG Yiqing, XU Yingjia Department of Cardiology, Minhang Center for Complex Cardiac Arrhythmias, Cardiovascular Research Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

【Abstract】 Objective: To analyze the mutation spectrum of the ISL1 gene associated with sporadic dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods:** Blood samples from 226 patients with sporadic DCM and 230 healthy individuals were collected, from which DNAs were extracted. The entire coding exons and flanking introns of the ISL1 gene were analyzed by polymerase chain reaction-DNA sequencing in all participants. The ClustalW2 software was used to analyze whether the mutated amino acid was evolutionarily conserved. The disease-causing potential of the identified mutation was predicted by PROVEAN, MutationTaster and PolyPhen-2. The functional characteristics of the mutant ISL1 were assayed by the dual-luciferase reporter assay system. **Results:** A new heterozygous missense ISL1 mutation, c. 706G>T (p. Asp236Tyr), was detected in one patient with sporadic DCM. The mutation was absent from the control individuals. The altered amino acid was completely conserved evolutionarily across species, and the mutation were predicted to be pathogenic. Biological analyses revealed that the mutant ISL1 was associated with significantly reduced transactivation of a target gene. **Conclusions:** The new ISL1 mutation is involved in the pathogenesis of DCM, which has potential clinical implications for the early prophylaxis and treatment of DCM.

【Key words】 Dilated cardiomyopathy; Genetics; Transcriptional regulation; ISL1; Genetic mutation; Reporter gene assay

基金项目:国家自然科学基金(81470372);上海市闵行区自然科学基金(2018MHZ072);上海市卫生健康委员会(201740064)

作者单位:200240 上海,复旦大学附属上海市第五人民医院心内科,闵行区复杂心律失常中心,心血管研究室

通信作者:徐迎佳,E-mail:xuyingjia@5thhospital.com

扩张型心肌病(DCM)是最常见的心肌疾病,发病率可高达 1/250^[1]。DCM 主要导致进行性加重的心力衰竭、血栓栓塞、心律失常,其 5 年死亡率高达 50%^[2]。DCM 的病因复杂多样,可继发于病毒性心肌炎、冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)和先天性心脏病等,但近年的研究发现 50% 以上的 DCM 主要是由遗传缺陷导致。目前已经发现了 60 多个 DCM 致病基因,其中大部分编码心肌节蛋白、细胞骨架蛋白、核膜蛋白和转录因子^[3-4]。作为关键的心脏转录因子编码基因之一,ISL1 基因突变可导致家族性 DCM^[4],但 ISL1 基因在散发性 DCM 患者中的突变谱仍有待分析。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2017 年 1 月至 2019 年 10 月,入选 226 例汉族且家族史阴性的散发性 DCM 患者(其中男 115 例,女 111 例,年龄为 42~65 岁,平均年龄 48 岁)和 230 名性别和年龄相匹配的无 DCM 家族史的汉族健康对照者(其中男 117 例,女 113 例,年龄为 43~65 岁,平均年龄 48 岁)。全部入选对象均经过详细病史回顾、全面体检、心脏超声检查和常规实验室检查。DCM 的诊断标准:在心脏负荷正常且无冠

心病和先天性心脏病等疾病的条件下,左室舒张末期内径>27 mm/m² 及左室射血分数<40% 或左室短轴缩短率<25%^[4-5]。本研究遵循医学伦理原则,经研究对象知情同意后收集其临床资料和外周静脉血标本约 1 mL,使用血液基因组 DNA 抽提试剂盒(美国 Promega 公司)提取基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 ISL1 基因的扩增 特异性扩增 ISL1 基因的全部编码外显子及外显子侧翼部分内含子所用的引物序列见表 1。使用热启动 Taq DNA 聚合酶(德国 Qiagen 公司)、基因组 DNA 模板和 ISL1 基因特异性扩增引物等聚合酶链反应(PCR)试剂在 T100 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上扩增 ISL1 基因片段。PCR 反应混合物的总体积是 50 μ L,包括 5 \times Q 溶液 10 μ L,10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,上、下游引物(20 μ mol/L)各 1 μ L,dNTP(各 2.5 mmol/L)4 μ L,基因组 DNA(50 ng/ μ L)2 μ L,热启动 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,双蒸水 26.5 μ L。所设定的 PCR 反应条件见参考文献[5]。PCR 扩增的基因片段经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,使用凝胶回收试剂盒(日本 TaKaRa 公司)进行纯化。

表 1 扩增 ISL1 基因编码区和剪接位点的引物序列

编码外显子	正向引物	反向引物	大小/bp
1	5'-GCGTCAGACCAATGGCGATG-3'	5'-CAGTAAGCATGCAGGCGTGG-3'	499
2	5'-TCCCAGAGTACGCCCTATAAGAG-3'	5'-AACAAGCCTCAATACCCCGGAA-3'	527
3	5'-TGCTGTTTACTTGGGGCGTC-3'	5'-TGTGCTCGGGGAATCAAGGG-3'	590
4	5'-TCCCTTTCACCCTCTTCGCC-3'	5'-TGAAAACCGTGCATCCTGC-3'	590
5	5'-TTGGGCTGAGCTGTGAAGGT-3'	5'-GCACCCTCCCACTGAATCT-3'	547
6	5'-GACTGAGAGCTCACCTACTCCC-3'	5'-CTTCGTGCATTTTCATGGAGCATT-3'	629

1.2.2 ISL1 基因突变谱分析 以回收纯化的 PCR 扩增产物为模板,使用 DNA 荧光测序试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)和 1 条 ISL1 基因特异性扩增引物在 T100 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行测序 PCR。测序 PCR 混合物的总体积是 20 μ L,包括预混合液 8 μ L,上游引物(2 μ mol/L)2 μ L,回收纯化的 DNA (20 ng/ μ L)4 μ L,双蒸水 6 μ L。使用 PCR 产物纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)对测序 PCR 产物进行纯化,然后后在 3130 XL 型 DNA 测序分析仪(美国 Applied Biosystem 公司)上进行测序分析。

将所测得的 ISL1 序列与美国 Nucleotide 数据

库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 ISL1 序列(登陆号:NM_002202.3)进行比对分析以识别 ISL1 基因变异。通过比较所检测的基因变异在 DCM 患者与正常对照者中的频率以鉴别出 DCM 相关 ISL1 基因突变。对于新发现的 ISL1 基因突变,检索 gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>)、SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)、HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)和万方(<http://librarian.wanfangdata.com.cn>)数据库以明确该突变是否已有报道。

1.2.3 突变氨基酸的保守性评估 借助在线软件 ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) 分析突变氨基酸在物种进化上的保守性。

1.2.4 ISL1 基因突变的致病性预测 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>) 分析所发现的 ISL1 基因突变是否具有致病性。

1.2.5 突变型 ISL1 的功能分析 构建真核表达质粒野生型 ISL1-pcDNA3.1 和 GATA4-pSSRa 以及萤火虫荧光素酶报告基因 NKX2.5-luc^[4]。以野生型 ISL1-pcDNA3.1 为模板,使用一对以点突变为中心、长 31 bp 的引物和定位诱变试剂盒(美国 Stratagene 公司)通过 PCR 产生 ASP236Tyr 突变型 ISL1-pcDNA3.1 并经过 DNA 酶 DpnI (英国 NEB 公司)选择和 DNA 测序证实。细胞培养及质粒转染方法见文献[4]。同时转染海肾荧光素酶报告质粒 pGL4.75(美国 Promega 公司)作为内对照以避免转染效率对结果的影响。转染后 48 h 收集、裂解细胞,使用双荧光素酶报告基因分析系统(美国 Promega 公司)在 GloMax-96 型荧光定量分析仪(美国 Promega 公司)上分析细胞裂解液中荧光素酶的活性。以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的活性之比值表示靶基因启动子的转录活性。每 1 次

细胞转染实验均按 1 式 3 份平行进行,以 3 次实验结果的平均值作为最终结果进行比较分析。

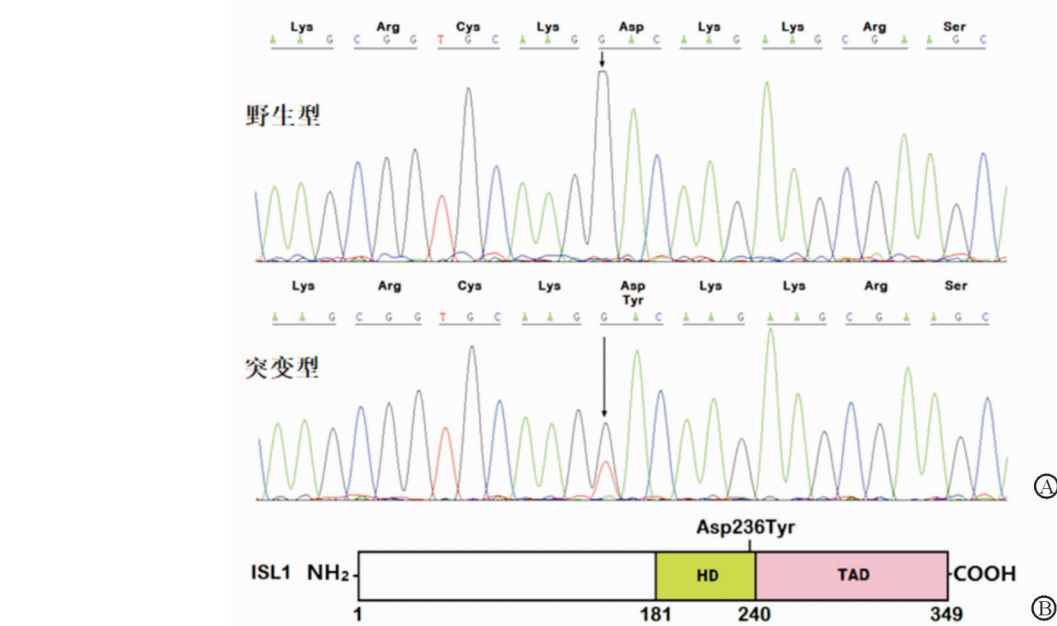
1.3 统计学分析

病例组与对照组之间连续变量如年龄、靶基因启动子的转录活性等的比较使用 Student's *t* 检验,而两组之间分类变量如性别、种族等的比较根据具体情况使用 Pearson's 卡方检验或 Fisher's 精确概率检验,以双侧检验值 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 发现 ISL1 基因新突变

通过直接 PCR-测序分析 226 例散发性 DCM 患者的 ISL1 基因,在 1 例 51 岁的女性 DCM 患者中发现了 1 个新的杂合突变,其 ISL1 基因编码核苷酸序列第 706 位的鸟嘌呤(G)变成了胞嘧啶(T),即 c.706G>T 突变,该突变可以导致 ISL1 蛋白氨基酸序列第 236 位的天冬氨酸(Asp)变成酪氨酸(Tyr),即 p. Asp236Tyr 突变。经过检索 gnomAD、SNP、HGMD、PubMed 和万方数据库,均无 ISL1 基因 c.706G>T 突变报道,表明本研究所发现的 ISL1 基因突变是 1 个新突变。ISL1 基因 c.706G>T 杂合突变及其纯合野生型对照碱基序列见图 1A。野生型 ISL1 蛋白结构域及所发现的 p. Asp236Tyr 突变在结构域上的位置见图 1B。



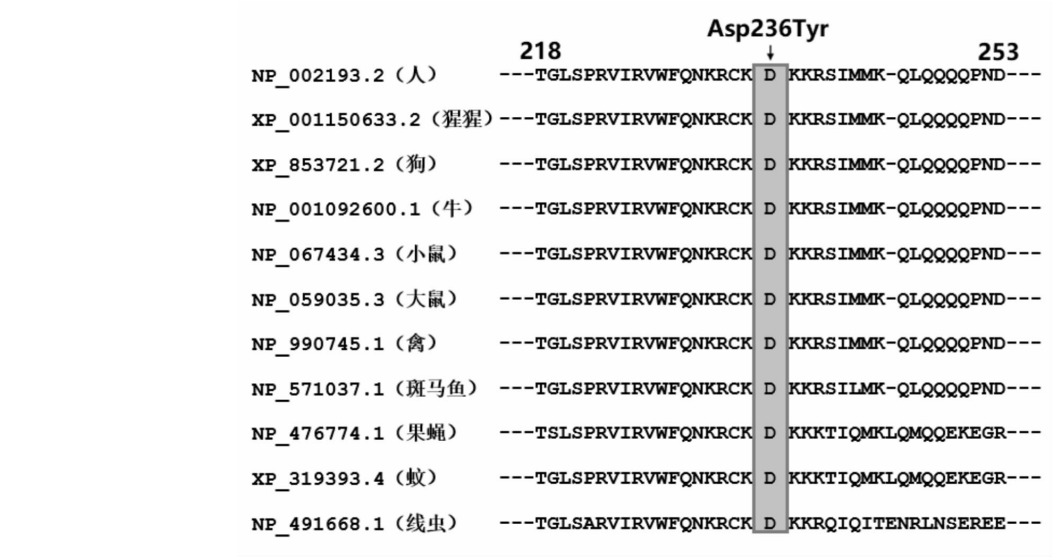
注: A 中箭头所指分别为 ISL1 基因 c.706G>T 杂合突变型 G/T 和纯合野生型 G/G 序列; B 中 NH₂-表示氨基末端, HD 表示同源盒结构域, TAD 表示转录激活结构域, -COOH 表示羧基末端

图 1 ISL1 基因 c.706G>T 杂合突变及其纯合野生型对照碱基序列

2.2 突变氨基酸在跨种进化上完全保守

通过在线软件 ClustalW2 比对分析人、猩猩、狗、牛、小鼠、大鼠、禽、斑马鱼、果蝇、蚊和线虫等物

种的 ISL1 蛋白序列,结果表明第 236 位的天冬氨酸在多物种的进化上完全保守(见图 2)。



注:箭头所指为 ISL1 蛋白氨基酸序列第 236 位的天冬氨酸

图 2 跨物种 ISL1 蛋白氨基酸序列比对分析结果

2.3 ISL1 基因 c. 706G>T 突变具有致病性

本研究所发现的 ISL1 基因 c. 706G>T 突变即 p. Asp236Tyr 突变经 MutationTaster 预测为致病性突变,预测值约等于 1.00;经 PolyPhen-2 预测为极可能致病突变,预测值等于 1.00(敏感性为 0.00,特异性为 1.00);经 PROVEAN 预测为恶性突变,预测值为 -8.553。此外,在 MutationTaster 数据库中也没有 ISL1 基因 c. 706G>T 突变,进一步表明本研究发现的 ISL1 基因 c. 706G>T 突变是新突变。

2.4 Asp236Tyr-突变型 ISL1 功能障碍

在转染的 10T1/2 细胞中,等量(250 ng)的野生型 ISL1-pcDNA3.1(ISL1)和 ASP236Tyr-突变型 ISL1-pcDNA3.1(ASP236Tyr)对靶基因 NKX2-5 启动子的转录激活作用分别为(5.61±0.96)倍和(1.66±0.52)倍($t=6.27749, P=0.00329$);而在同时转染了等量(250 ng)的野生型 GATA4-pSSRa 后,所诱导的转录激活分别为(23.82±2.76)倍和(9.18±1.42)倍($t=8.16253, P=0.00123$)。见图 3。

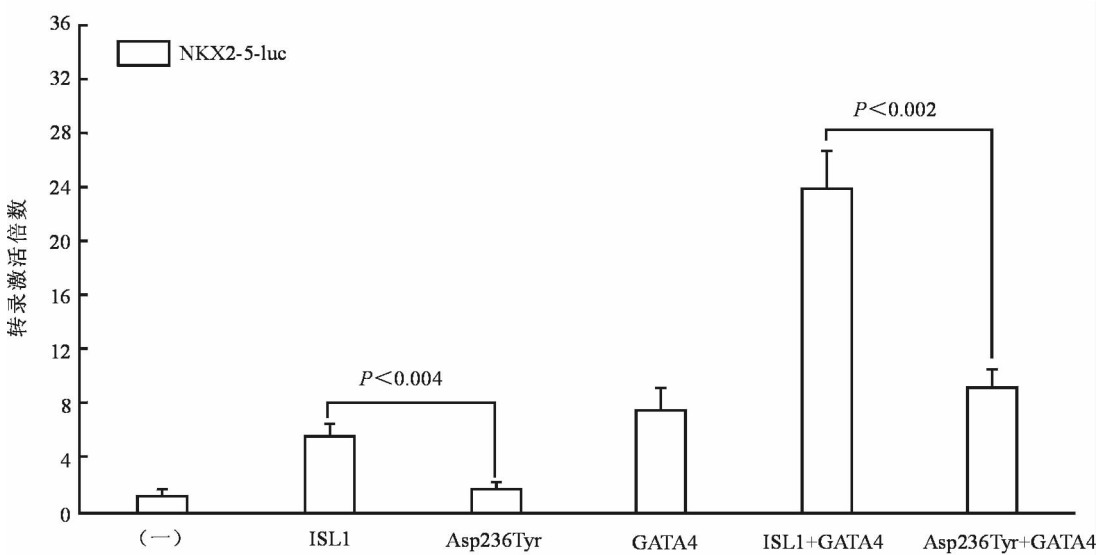


图 3 Asp236Tyr-突变型 ISL1 对靶基因 NKX2-5 的转录激活功能障碍

3 讨论

本研究在 226 例散发性 DCM 患者中发现了 1 例患者 ISL1 基因 1 个新的杂合错义突变 c. 706G>T (p. Asp236Tyr), 突变率约为 0.44%。该基因突变不存在于 230 名健康对照者, 被改变的氨基酸在人、猩猩、狗、牛、小鼠、大鼠、禽、斑马鱼、果蝇、蚊和线虫等多物种的进化上完全保守, 在线软件 MutationTaster、PolyPhen-2 和 PROVEAN 均预测该突变是致病突变。功能分析表明该突变显著降低了 ISL1 对靶基因 NKX2.5 的转录激活效应, 而且损害了 ISL1 与 GATA4 之间的协同激活功能。因此, ISL1 基因 c. 706G>T (p. Asp236Tyr) 突变极有可能是该 DCM 患者的分子病因, 但该基因突变导致 DCM 的具体机制仍需要深入研究。

ISL1 基因定位于人类常染色体 5q11.1, 编码一种由 349 个氨基酸所组成的转录因子蛋白^[4]。该蛋白有 2 个功能上重要的结构域(见图 1B), 即同源盒结构域(HD)和转录激活结构域(TAD)。ISL1 通过 HD 与靶基因启动子结合, 并通过 TAD 激活靶基因的表达, 从而在胚胎心脏发育和出生后心脏结构重构方面发挥关键作用^[6-9]。有研究表明, ISL1 可以单独激活或与其转录合作伙伴如 TBX20 和 GATA4 等协同激活靶基因 MEF2C 和 NKX2-5 等的表达^[4], 而 TBX20、GATA4、MEF2C 和 NKX2-5 这些心脏核心转录因子都在心脏发育与重构方面具有重要调控功能, 功能缺失性突变不仅可导致先天性心脏病, 还可导致 DCM^[10-16]。因此, ISL1 基因突变很可能通过影响 MEF2C 和 NKX2-5 等其他心脏关键基因的表达而导致 DCM。

ISL1 遗传缺陷导致 DCM 的易感性增加可部分归因于心脏发育不全和适应性重构不良。在胎心发育期间, 第二生心区 ISL1-阳性祖细胞产生了流出道细胞以及心房、右心室和左心室的部分细胞^[6], 来源于诱导多能干细胞、胚胎干细胞、胚胎或出生后心脏组织的表达 ISL1 的细胞具有多能性, 可以形成不同类型的心脏细胞, 包括心肌细胞、内皮细胞、起搏细胞以及平滑肌细胞^[7-9]。此外, 出生后的小鼠、大鼠和人的心肌细胞也存在 ISL1⁺心脏祖细胞, 提示 ISL1 在出生后的心脏再生和适应方面具有重要作用^[4,8-9]。在裸鼠心肌梗死模型的梗死区心肌内注入 ISL1⁺心脏祖细胞, 可观察到梗死区植入的细胞增殖、分化成心肌细胞, 而模型小鼠的心脏血管增生增加, 心肌梗死面积减小, 心功能

增强^[17]。在另一项研究中, 对心肌梗死小鼠模型植入来源于 ISL1⁺心脏祖细胞的功能性心脏补片, 可以改善小鼠心功能, 减少左室心肌疤痕面积, 减轻心肌纤维化及心力衰竭^[18]。这些研究表明 ISL1 在心脏重构和功能适应方面的重要作用。

总之, 本研究发现 ISL1 基因功能缺失性突变可导致散发性 DCM, 进一步扩大了 DCM 相关 ISL1 基因突变谱, 对 DCM 患者的遗传咨询和早期精准医学防治具有一定的意义。

参考文献

- [1] Merlo M, Cannatà A, Gobbo M, et al. Evolving concepts in dilated cardiomyopathy[J]. Eur J Heart Fail, 2018, 20(2): 228-239.
- [2] Tabish AM, Azzimato V, Alexiadis A, et al. Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of dilated cardiomyopathy [J]. Biophys Rev, 2017, 9(3): 207-223.
- [3] McNally EM, Mestroni L. Dilated cardiomyopathy: genetic determinants and mechanisms [J]. Circ Res, 2017, 121(7): 731-748.
- [4] Xu YJ, Wang ZS, Yang CX, et al. Identification and functional characterization of an ISL1 mutation predisposing to dilated cardiomyopathy [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2019, 12(3):257-267.
- [5] 李文昭, 徐迎佳, 李若谷, 等. 特发性扩张型心肌病相关 GATA6 基因新突变的识别[J]. 国际心血管病杂志, 2018, 45(5):34-37.
- [6] Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart[J]. Dev Cell, 2003, 5(6):877-889.
- [7] Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages [J]. Nature, 2005, 433(7026):647-653.
- [8] Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic isl1⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification[J]. Cell, 2006, 127(6):1151-1165.
- [9] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, et al. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages[J]. Nature, 2009, 460(7251):113-117.
- [10] Zhou YM, Dai XY, Huang RT, et al. A novel TBX20 loss-of-function mutation contributes to adult-onset dilated cardiomyopathy or congenital atrial septal defect [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4):3307-3314.
- [11] Zhao CM, Sun B, Song HM, et al. TBX20 loss-of-function mutation associated with familial dilated cardiomyopathy[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(2):325-332.
- [12] Li RG, Li L, Qiu XB, et al. GATA4 loss-of-function mutation underlies familial dilated cardiomyopathy [J].

- Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(4):591-596.
- [13] Li J, Liu WD, Yang ZL, et al. Prevalence and spectrum of GATA4 mutations associated with sporadic dilated cardiomyopathy[J]. Gene, 2014, 548(2):174-181.
- [14] Yuan F, Qiu ZH, Wang XH, et al. MEF2C loss-of-function mutation associated with familial dilated cardiomyopathy[J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(3):502-511.
- [15] Yuan F, Qiu XB, Li RG, et al. A novel NKX2-5 loss-of-function mutation predisposes to familial dilated cardiomyopathy and arrhythmias[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(2):478-486.
- [16] Xu JH, Gu JY, Guo YH, et al. Prevalence and spectrum of NKX2-5 mutations associated with sporadic adult-onset dilated cardiomyopathy [J]. Int Heart J, 2017, 58(4): 521-529.
- [17] Li Y, Tian S, Lei I, et al. Transplantation of multipotent Isl1⁺ cardiac progenitor cells preserves infarcted heart function in mice [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1530-1542.
- [18] Wang L, Meier EM, Tian S, et al. Transplantation of Isl1⁺ cardiac progenitor cells in small intestinal submucosa improves infarcted heart function[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):230.
- (收稿:2020-02-25 修回:2020-03-18)
(本文编辑:丁媛媛)

勤洗手 预防新冠肺炎

