

先天性房间隔缺损相关 TBX5 基因新突变研究

王珊珊 王天明 刘兴元

【摘要】 目的:研究先天性房间隔缺损(ASD)相关 TBX5 基因新突变。 方法:从中国汉族人群入选 62 例 ASD 患者和 108 名健康对照者,提取基因组 DNA。对全部研究对象的 TBX5 基因的整个编码区进行测序分析以发现新的致病突变。构建野生型及突变型 TBX5 的真核表达载体,利用脂质体转染 COS-7 细胞,同时转染报告质粒心房利钠因子-荧光素酶及内对照质粒,应用双荧光素酶报告基因分析试剂研究突变型 TBX5 的转录活性。 结果:在 1 例散发型 ASD 患者中发现了 1 个杂合性 TBX5 基因新突变,即 c.318C>G(p. Y106X)突变。该无义突变不存在于 108 名健康对照者。功能分析表明突变型 TBX5 对靶基因的转录激活功能丧失。 结论:发现 1 个 ASD 相关 TBX5 基因功能缺失性新突变,对 ASD 的个体化防治具有潜在的临床意义。

【关键词】 房间隔缺损;遗传学;转录因子;TBX5;报告基因分析

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.05.012

Mutation of the TBX5 gene associated with congenital atrial septal defect WANG Shanshan¹, WANG Tianming², LIU Xingyuan². 1. Department of Neonatology, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 201204; 2. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China.

【Abstract】 Objective: To study a novel TBX5 mutation involved in congenital atrial septal defect (ASD). **Methods:** A total of 62 patients of Han nationality with ASD and 108 healthy individuals were recruited, from which genomic DNA were extracted. The entire coding regions of the TBX5 gene were sequenced and analyzed for identification of novel mutation. The eukaryotic expression plasmid expressing wild-type and mutant TBX5 was constructed, respectively, and was transfected into COS-7 cells using lipofectamine, together with luciferase reporter plasmid of atrial natriuretic factor and internal control plasmid. The transcriptional activity of mutant TBX5 was measured by utilizing dual-luciferase reporter gene assay kit. **Results:** A novel heterozygous TBX5 mutation c.318C>G (p. Y106X), was discovered in a patient with sporadic ASD. The nonsense mutation was absent from the 108 healthy control subjects. Functional analysis demonstrated that mutant TBX5 lost the ability of transcriptional activation at target gene. **Conclusions:** The novel TBX5 loss-of-function mutation is involved in ASD, which has potential clinical implications for the personalized prophylaxis and treatment of ASD.

【Key words】 Atrial septal defect; Genetics; Transcription factor; TBX5; Reporter gene assay

先天性心脏病是人类最常见的发育畸形,其中以心房间隔缺损(ASD)、心室间隔缺损的发生率最高^[1]。严重的心脏间隔缺损可导致脑损伤或中枢

神经发育延迟、肺动脉高压、血栓栓塞、感染性肺炎或心内膜炎、充血性心力衰竭、心律失常,甚至心源性猝死^[1-3]。越来越多的研究表明遗传缺陷是先天性心脏缺损的主要病因,已经发现了 60 多个致病基因,其中大部分编码的是心脏核心转录因子^[4-5]。作为一个重要转录因子,国外的研究发现 TBX5 基因突变可导致多种类型的先天性心脏病,但以 ASD 最为多见^[6-7]。因此,有必要研究 TBX5 基因在中国汉

基金项目:上海市自然科学基金(16ZR1432500)

作者单位:201204 上海,同济大学医学院附属第一妇婴保健院
新生儿科(王珊珊);200065 上海,同济大学医学院附属同济医院
儿科(王天明、刘兴元)

信作者:刘兴元,E-mail:liuxingyuan402@163.com

族 ASD 患者中的突变率并揭示其致病机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

在 2017 年 3 月至 2019 年 7 月间从中国汉族人群收集了 62 例无血缘关系的新生儿 ASD 患儿和 108 名无血缘关系且年龄、性别相匹配的健康对照者。全部入选研究对象均详细了解病史及家族史,进行全面体格检查、超声心动图检查和常规化验检查。所有 ASD 患者均有超声心动图检查证据,所有健康对照者的超声心动图检查结果正常且无先天性心脏病家族史。在 62 例 ASD 患儿中,男 37 例,女 25 例,年龄为 0~28 d,平均年龄 10 d,有阳性家族史者 4 例;在 108 名健康对照者中,男 65 名,女 43 名,年龄为 0~28 d,平均年龄 10 d。本研究遵循医学伦理规范,经法定监护人知情同意后收集其外周静脉全血约 0.2 mL,使用血液基因组 DNA 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 TBX5 基因体外扩增 通过聚合酶链反应(PCR)体外特异性扩增 TBX5 基因整个编码区,剪接位点所用的引物见参考文献[8]。应用热启动高保真 DNA 聚合酶(德国 Qiagen 公司)和 TBX5 基因扩增引物等试剂,以基因组 DNA 为模板,在 C100 Touch 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上扩增 TBX5 基因片段。每一个 PCR 的总体积是 50 μ L,包括双蒸水 26 μ L、5 \times PCR 缓冲液 10 μ L(含有 dNTP)、5 \times Q 液 10 μ L、正向引物(20 μ mol/L)1 μ L、逆向引物(20 μ mol/L)1 μ L、基因组 DNA(100 ng/ μ L)1 μ L、Taq DNA 聚合酶(2.5 units/ μ L)1 μ L。PCR 条件:首先 95 $^{\circ}$ C 热激活 5 min,随后 35 个循环,每一循环 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、62 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延长 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 延长 8 min。所扩增的产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用凝胶回收试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化。

1.2.2 TBX5 基因测序分析 使用正向或反向 TBX5 基因扩增引物,以纯化的基因片段为模板,应用 DNA 循环测序试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)在 ProFlex 型 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)上进行测序 PCR 反应。每一测序 PCR 的总体积为 20 μ L,其中包括双蒸水 9 μ L、纯化的 DNA 片段(50 ng/ μ L)2 μ L、上游或下游引物(2 μ mol/L)1 μ L、预混合液 8 μ L。测序 PCR 的条件见参考文献[9]。测序 PCR 产物经纯化后在 3730 型 DNA 测序仪(美国

Applied Biosystems 公司)上进行测序。将所测的 NTBX5 序列与 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 TBX5 序列(登陆号:NM_000192.3)进行对比分析以识别 TBX5 基因突变。如果发现 TBX5 基因突变,检索 SNP(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)、genomAD(<http://gnomad.broadinstitute.org>)、PubMed(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)和万方(<http://librarian.wanfangdata.com.cn>)数据库,以明确所发现的基因突变是否有报道。

1.2.3 真核表达质粒构建及定位诱变 野生型 TBX5-pcDNA3.1 真核表达质粒构建如前所述[8]。以野生型 TBX5-pcDNA3.1 为模板,使用一对以突变点为中心、长 31 个碱基的互补引物和 QuikChange 定位诱变试剂盒(美国 Stratagene 公司)通过 PCR 引入所发现的点突变,经 DpnI 酶切、凝胶电泳分离后纯化可得突变型 TBX5-pcDNA3.1 质粒,然后经测序证实。表达萤火虫荧光素酶的报告质粒心房利钠因子-荧光素酶(ANF-luc)及表达海肾荧光素酶的对照质粒 pGL4.75 如前所述[8]。

1.2.4 细胞培养、转染及报告基因分析 COS-7 细胞的培养、借助脂质体进行的细胞质粒转染如前所述[8]。转染后 48 h 收集、裂解细胞,应用双荧光素酶报告基因分析试剂盒(美国 Promega 公司)依次检测萤火虫、海肾荧光素酶的活性,并以二者的比值表示 ANF 基因启动子的转录活性。每种质粒转染实验均 1 式 3 份平行进行,以 3 次实验结果的平均值作为最终的结果。

1.3 统计学分析

连续变量以均数 \pm 标准差表示。两组组间连续变量的比较使用非配对 Student's *t* 检验;分类变量的比较使用 Fisher's 精确概率检验或 Pearson's 卡方检验。以双侧检验值 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 发现 TBX5 基因新突变

通过对 62 例无血缘关系的 ASD 患儿的 TBX5 基因进行测序分析,结果在 1 例家族史阴性的 ASD 患儿中发现了 1 个杂合性突变,其 TBX5 基因编码核苷酸序列第 318 位的胞嘧啶(C)变成了鸟嘌呤(G),即 c.318C>G 突变,相应地氨基酸编码序列第 106 位的酪氨酸密码子变成了终止密码子,即

p. Y106X 突变, 突变率约为 1.6%。该无义突变不存在于 108 名健康对照新生儿, 在 SNP、genomAD、PubMed 和万方数据库中也未见报道。该携带 TBX5 基因突变的 ASD 患儿的超声心动图见图 1。TBX5 基因 c. 318C>G 杂合突变及其纯合野生型对照碱基序列见图 2。

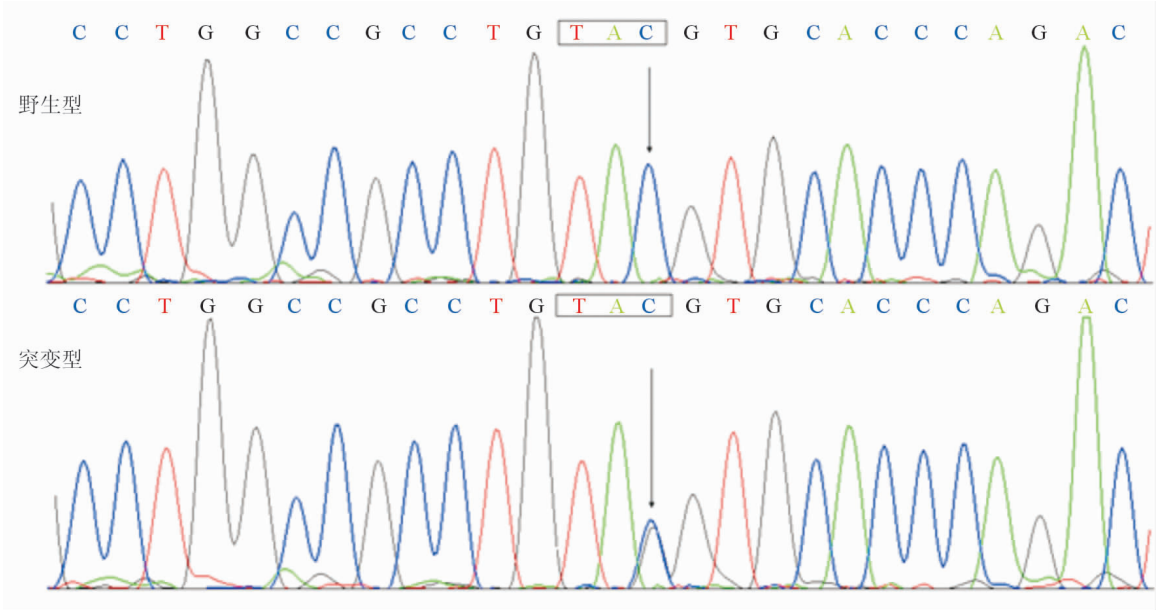
2.2 突变型 TBX5 的转录活性丧失

如图 3 所示, 等量(0.6 μg)的野生型和 Y106X 突变型 TBX5 对靶基因心房利钠肽(ANP)启动子的转录激活作用分别约为 12 倍和 1 倍(纯合突变型 TBX5 与纯合野生型 TBX5 比较: $t = 13.89, P < 0.01$); 而等量(各 0.3 μg)的野生型和 Y106X 突变型 TBX5 共转染时, 对 ANP 启动子的转录激活作用

约为 5 倍(杂合突变型 TBX5 与纯合野生型 TBX5 比较: $t = 7.4, P < 0.01$)。

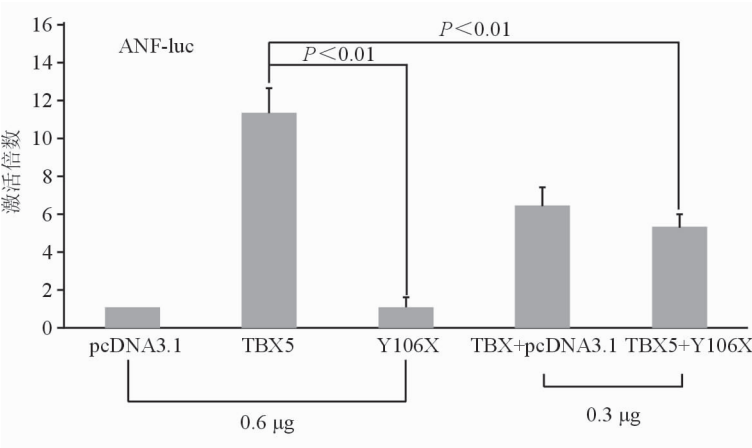


图 1 携带 TBX5 基因突变的 ASD 患儿的超声心动图



注: 箭头分别指向 TBX5 基因 c. 318C>G 杂合突变型 C/G 和纯合野生型 C/C 序列

图 2 TBX5 基因 c. 318C>G 杂合突变及其纯合野生型对照碱基序列



注: 与纯合野生型 TBX5 相比, P 均 < 0.01

图 3 Y106X 突变型 TBX5 对靶基因 ANF 启动子的转录激活作用

3 讨论

本研究在 1 例先天性 ASD 新生患儿中检测出了 1 个新的 TBX5 基因杂合突变 c. 318C>G (p. Y106X), 该无义突变不存在于 108 名健康对照者。生化分析表明该突变导致 TBX5 对靶基因的转录激活功能障碍。因此, TBX5 基因 c. 318C>G (p. Y106X) 突变很可能是导致该新生儿患者 ASD 的分子病因。

人类 TBX5 基因位于染色体 12q24. 1, 编码蛋白质由 518 个氨基酸组成。TBX5 蛋白含有一个功能上非常重要的结构域, 被称为 T 盒(氨基酸 53-241), 主要作用是与特定的靶基因启动子 DNA 结合以激活或增加其表达以及与其他转录合作伙伴相互作用协同调节靶基因的表达^[6-8]。先前的实验研究表明, TBX5 可单独激活或与转录合作伙伴 GATA4、GATA6、NKX2-5 和 TBX20 等协同激活在心脏发育过程中表达的多个重要靶基因, 包括 ANP、肌球蛋白重链 6 (MYH6)、血清反应因子 (SRF) 和缝隙连接蛋白 40 (CX40) 等, 而且 GATA4、GATA6、NKX2-5 和 TBX20 等功能缺失性突变均可导致 ASD^[5-7]。在本研究中, 在 ASD 患者发现的 TBX5 突变位于 T 盒, 导致 TBX5 蛋白截短, 失去了大部分 T 盒结构, 预测可导致 TBX5 的转录功能障碍。报告基因分析表明, 突变型 TBX5 对靶基因 ANF 的转录激活作用消失。这些研究结果表明, 基因突变所致的 TBX5 单倍性不足可能是 ASD 的分子机制之一。

TBX5 基因功能异常导致胚胎心脏发育畸形如 ASD 等已在动物模型得到证实。在小鼠胚胎发育过程中, TBX5 大量表达于心脏新月体和线性心脏管、左心室、室间隔、小梁、心房以及心脏传导系统^[10-11]。TBX5 基因敲除纯合子小鼠胚胎期死亡, 主要原因在于心脏环化障碍以及左心室和窦房结发育不全; 而 TBX5 基因敲除杂合子小鼠则可表现为 ASD、室间隔缺损、心内膜垫缺损、左心室发育不良以及传导系统功能异常, 包括房室和束支传导阻滞等^[10-12]。这些动物实验研究表明 TBX5 在胚胎心脏正常发育方面发挥着关键作用。

人类 TBX5 大量表达于胚胎及出生后心脏^[13], TBX5 基因突变可导致 Holt-Oram 综合征即手心综合征, 表现为手、前肢及心脏畸形以及传导阻滞, 而且心脏畸形可单独出现, 其中以 ASD 最为常见^[6]。研究发现, TBX5 基因功能丧失性突变还可

导致扩张型心肌病^[8,14]、心房颤动^[15]、急性心肌梗死^[16]。本研究在 ASD 患儿发现 TBX5 基因功能丧失性突变, 提示其将来可能易于发生扩张型心肌病、心房颤动或急性心肌梗死。

总之, 本研究发现 TBX5 基因新突变可导致 ASD, 并初步揭示了其致病机制, 对 ASD 的个体化防治具有一定的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2019, 139 (10): e56-e528.
- [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] Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, et al. Genetic basis for congenital heart disease: revisited: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2018, 138(21): e653-e711.
- [5] 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.
- [6] Al-Qattan MM, Abou Al-Shaar H. Molecular basis of the clinical features of Holt-Oram syndrome resulting from missense and extended protein mutations of the TBX5 gene as well as TBX5 intragenic duplications[J]. Gene, 2015, 560 (2): 129-136.
- [7] Vanlerberghe C, Jourdain AS, Ghomid J, et al. Holt-Oram syndrome: clinical and molecular description of 78 patients with TBX5 variants[J]. Eur J Hum Genet, 2019, 27(3): 360-368.
- [8] Zhang XL, Qiu XB, Yuan F, et al. TBX5 loss-of-function mutation contributes to familial dilated cardiomyopathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 459(1): 166-171.
- [9] 董斌斌, 刘兴元, 杨委清. 先天性心脏缺损相关 NR2F2 基因新突变研究[J]. 国际心血管病杂志, 2019, 46(4): 240-243.
- [10] Bruneau BG, Logan M, Davis N, et al. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome[J]. Dev Biol, 1999, 211(1): 100-108.
- [11] Moskowitz IP, Pizard A, Patel VV, et al. The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system [J]. Development, 2004, 131(16): 4107-4116.
- [12] Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease[J]. Cell, 2001, 106(6): 709-721.

- [13] Hatcher CJ, Goldstein MM, Mah CS, et al. Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis[J]. Dev Dyn, 2000, 219(1):90-95.
- [14] Zhou W, Zhao L, Jiang JQ, et al. A novel TBX5 loss-of-function mutation associated with sporadic dilated cardiomyopathy[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1):282-288.
- [15] Wang ZC, Ji WH, Ruan CW, et al. Prevalence and spectrum of TBX5 mutation in patients with lone atrial fibrillation[J]. Int J Med Sci, 2016, 13(1):60-67.
- [16] Wang S, Zhang J, He X, et al. Identification and functional analysis of genetic variants in TBX5 gene promoter in patients with acute myocardial infarction[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2019, 19(1):265.

(收稿:2020-01-21 修回:2020-05-13)

(本文编辑:丁媛媛)

