

KLF15 基因突变导致心房颤动的机制

乔祺 杨晨曦 顾佳宁 柯尊平 杨奕清 徐迎佳

【摘要】 目的:探讨 *KLF15* 基因突变导致心房颤动(房颤)的机制。 方法:收集 152 例特发性房颤患者和 206 名健康对照者的临床数据和血标本,提取基因组 DNA。测序分析 *KLF15* 基因以寻找致房颤突变。克隆 *KLF15* 基因,构建其野生型和突变型表达质粒,转染培养的 HeLa 细胞,应用双荧光报告基因分析系统研究突变体的功能特点。结果:在 1 例特发性房颤患者中发现 *KLF15* 基因新突变 c. 946G>T (p. Glu316X),该突变不存在于 206 名对照者中。功能分析表明该突变型 *KLF15* 蛋白对靶基因的转录激活作用丧失。 结论:首次揭示 *KLF15* 基因功能丧失性突变是部分房颤的分子病因,对房颤患者的遗传咨询及预后风险评估具有潜在意义。

【关键词】 心房颤动;遗传学;转录因子;*KLF15*;报告基因分析

doi:10. 3969/j. issn. 1673-6583. 2021. 01. 013

Mechanism of atrial fibrillation induced by *KLF15* mutation QIAO Qi, YANG Chenxi, GU Jianing, KE Zumping, 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 explore the mechanism of atrial fibrillation (AF) resulted from a mutation in the *KLF15* gene. **Methods:** Clinical data and peripheral venous blood samples were collected from 152 unrelated patients affected with idiopathic AF and 206 unrelated healthy control individuals. Genomic DNA was isolated from each participant. Sequencing analysis of the *KLF15* gene was performed in all study subjects to identify a mutation responsible for AF. The *KLF15* gene was cloned, and the plasmid expressing either wild-type or mutant-type *KLF15* protein was constructed. HeLa cells were cultivated, and transfected with various expression plasmids. The functional characteristics of mutant *KLF15* were measured by utilizing a dual-luciferase reporter assay system. **Results:** A novel *KLF15* mutation, c. 946G>T (p. Glu316X), was identified in a patient with idiopathic AF, which was absent in 206 control people. Functional analysis demonstrated that the Glu316X-mutant *KLF15* protein lost transcriptional activation of a target gene. **Conclusions:** This investigation firstly reveals *KLF15* loss-of-function mutation as a molecular etiology for AF in a subset of cases, implying potential implications for the genetic counseling and prognostic risk evaluation of patients suffering from AF.

【Key words】 Atrial fibrillation; Genetics; Transcriptional factor; *KLF15*; Reporter gene assay

心房颤动(房颤)作为最常见的一种持续性心律失常可导致患者血栓栓塞性脑卒中、认知功能障碍或痴呆、急性心肌梗死、心动过速性心肌病、充血

性心力衰竭、室性心律失常以及心源性死亡等^[1-3]。既往研究表明,房颤可继发于瓣膜性心脏病、高血压性心脏病、先天性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病以及甲状腺功能亢进等疾病^[4],但部分房颤患者无明确的基础性疾病或传统危险因素,称为特发性房颤,主要由遗传缺陷导致^[5]。目前已经发现了 50 多个房颤致病基因,其中大部分编码心脏钾通道、钠通道、钙通道和缝隙连接通道^[5]。研究发现,心脏转录因子编码基因 *NKX2-5*、*TBX5* 和

基金项目:上海市闵行区自然科学基金(2018MHZ072, 2019MHZ014, 2020MHZ041);上海市卫生健康委员会基金(201740064)

作者单位:200240 复旦大学附属上海市第五人民医院内科,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

SHOX2 等突变也可导致房颤^[6]。作为心脏转录因子,KLF15 可调节心肌瞬时外向钾通道 β 亚单位 KChIP2 的表达,而 KChIP2 蛋白与 α 亚单位即 KCND₃ 基因编码的 Kv4.3 蛋白构成完整的钾通道,所产生的瞬时外向钾电流(Ito)对心脏的快速复极具有重要作用,而且该通道电流异常可诱发房颤^[7]。此外,KCND₃ 基因突变也可通过改变 Ito 而导致房颤^[8]。因此,推测 KLF15 基因突变也可能导致房颤。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2017 年 10 月至 2019 年 10 月,本研究入选 152 例特发性房颤患者,其中男 87 例,女 65 例,年龄为 32~57 岁,平均年龄(53±8)岁。对照者为 206 名性别、年龄和种族均匹配的健康人,其中男 118 名,女 88 名,年龄为 33~56 岁,平均年龄(53±6)岁。所有入选对象均经过病史回顾、体格检查、常规血液化验检查、标准 12 导联心电图检查和心脏超声检查。特发性房颤的诊断依据 2014 年美国心脏病学会/美国心脏协会发布的房颤治疗指南^[6]。特发性房颤组房颤家族史阳性 32 例(约占 21%),对照组房颤家族史均为阴性,两组均无传统房颤危险因素。本研究遵循医学伦理学准则,经研究对象知情同意后收集其外周静脉全血约 2 mL,使用血液基因组 DNA 纯化试剂盒(美国 Promega 公

司)提取 DNA。

1.2 方法

1.2.1 KLF15 基因的扩增 从 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中获取 KLF15 的基因组 DNA 序列(登陆号:NC_000003.12),借助在线程序 Primer3web(<http://primer3.ut.ee>)设计特异性扩增 KLF15 基因编码外显子、剪接位点及部分 5'和 3'端非翻译区的引物序列见表 1。以基因组 DNA 为模板,使用热启动 Taq DNA 聚合酶试剂盒(德国 Qiagen 公司)和所设计的 KLF15 基因特异性扩增引物等聚合酶链反应(PCR)试剂在 S1000 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上扩增 KLF15 基因目的片段。PCR 反应物的总体积为 25 μ L,包括双蒸水 12.25 μ L,5×Q 溶液 5 μ L,10×PCR 缓冲液 2.5 μ L,上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L,dNTP(各 2.5 mmol/L)2 μ L,基因组 DNA(100 ng/ μ L)2 μ L 和热启动 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.25 μ L。PCR 的反应条件设置如文献[9-10],即 95℃预变性 15 min,随后进行 35 个循环,每个循环包括 94℃变性 30 s、62℃退火 30 s 和 72℃延伸 1 min,最后 72℃延伸 8 min。PCR 产物经过 1.2%琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收,应用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)进行纯化。

表 1 扩增 KLF15 基因编码外显子、剪接位点及部分 5'和 3'端非翻译区的引物序列

外显子	正向引物	反向引物	大小
1-A	5'-CTTCTGACCAGGCCTCCTGT-3'	5'-AGCCTACCCTGGAGGAGATTGA-3'	558 bp
1-B	5'-GGGGACCCTCCCTAATCCT-3'	5'-GTCCTTGCTGTTGCCCTCAG-3'	743 bp
2	5'-CCTGCTGCACACCCAAGTAAG-3'	5'-GCGGGTTCGAGGCTCTAAGT-3'	517 bp

1.2.2 KLF15 基因的测序分析 以纯化后的 PCR 产物为模板,使用 DNA 测序试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)和 1 条 KLF15 基因特异性扩增引物在 Veriti 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行测序反应。测序 PCR 混合物的总体积为 10 μ L,其中双蒸水 4 μ L,预混合液 4 μ L,纯化的 DNA 片段(20 ng/ μ L)1 μ L,上游引物(2 μ mol/L)1 μ L。测序 PCR 的条件如文献[9-10],即 30 个循环,每个循环 95℃变性 20 s,50℃退火 15 s,60℃延伸 1 min。测序 PCR 产物经过用 QIAquick 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)纯化后在

3130 XL 型 DNA 测序仪(美国 Applied Biosystem 公司)上进行测序。将所测的 KLF15 序列与 Nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 KLF15 序列(登陆号:NM_014079.4)进行对比分析以发现 KLF15 基因变异。如识别出 KLF15 基因变异,则应用同样的方法测序分析 206 名对照者的 KLF15 基因,同时检索 SNP(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)、HGMD(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>)、PubMed(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)和万方(<http://www.wanfangdata.com.cn>)数据库以

确认所发现的基因变异是否已被报道。

1.2.3 *KLF15* 基因的克隆及表达质粒的构建 如文献[11],使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)抽提心肌总 RNA,然后使用逆转录酶 SuperScript III(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)通过逆转录-PCR 制备 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 PfuUltra 高保真 Taq DNA 聚合酶(美国 Stratagene 公司)和 1 对特异性引物(正向引物:5'-TCTGAATTCTCGTCCGGC GTGCGCCAAGTTC-3',反向引物:5'-AGAGCGGC CGCTGGGGATCCGGGGTGACGGA-3')通过 PCR 扩增 *KLF15* 基因全长 cDNA(包括整个 cDNA 及部分 5' 和 3' 端非翻译区在内的总长度为 1340 bp)。PCR 反应物的总体积为 50 μ L,包括双蒸水 37 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,cDNA (20 ng/ μ L)1 μ L 和高保真 Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)1 μ L。PCR 的反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,接着进行 30 个循环,每一循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、62 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,最后 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。将扩增的 *KLF15* 基因全长 cDNA 纯化后用核酸内切酶 EcoRI 和 NotI 酶切,然后通过 T4 DNA 连接酶在 EcoRI-NotI 克隆位点插入 pcDNA3.1 质粒,从而构建野生型 *KLF15* 的真核表达质粒 *KLF15*-pcDNA3.1。以野生型 *KLF15*-pcDNA3.1 为模板,使用 QuickChange 定位诱变试剂盒(美国 Stratagene 公司)和 1 对以点突变为中心、长 31 个寡核苷酸引物通过 PCR 产生突变型 Glu316X-*KLF15*-pcDNA3.1,通过 DNA 酶 DpnI(美国 NEB 公司)切除模板、测序证实序列无误后转化感受态细胞适量克隆野生型和突变型 *KLF15*-pcDNA3.1。类似地,使用 PfuUltra 高保真 Taq DNA 聚合酶(美国 Stratagene 公司)和 1 对特异性引物(正向引物:5'-GCCGGTA CCTAGGGCATGGGGCACTAAGC -3';反向引物:5'-GCCAAGCTTGGCCCCGGCGCCCCGCTCC-3')通过 PCR 扩增 *KLF15* 的靶基因 KChIP2(登录号:NC_000010.11)的启动子区域(编码起始位点上游-1至-1701),经 KpnI 和 HindIII 双酶切后插入荧光素酶(luc)表达质粒 pGL4.10(美国 Promega 公司)的克隆位点构建报告基因表达质粒 KChIP2-luc 并经测序证实。

1.2.4 细胞转染及报告基因分析 使用改良的 DMEM 细胞培养基(美国 Thermo Fisher 公司)并添

加 10%胎牛血清(美国 Thermo Fisher 公司)在 37 $^{\circ}$ C 含 5%CO₂ 的大气条件下培养 HeLa 细胞。培养 24 h 后接种于 24 孔板,继续培养 36 h 后借助脂质体 Lipofectamine 3000(美国 Invitrogen 公司)进行质粒的细胞转染。每次转染细胞时各种 *KLF15* 表达质粒的用量如下:(1)400 ng 空质粒 pcDNA3.1 即(-);(2)400 ng 野生型 *KLF15*-pcDNA3.1 质粒即(*KLF15*);(3)400 ng 突变型 Glu316X-*KLF15*-pcDNA3.1 质粒即(Glu316X);(4)200 ng 野生型 *KLF15*-pcDNA3.1 + 200 ng pcDNA3.1;(5)200 ng 野生型 *KLF15*-pcDNA3.1 + 200 ng 突变型 Glu316X-*KLF15*-pcDNA3.1。每次转染细胞时还同时转 800 ng 报告基因表达质粒 KChIP2-luc 和表达海肾荧光素酶的内对照质粒 pGL4.75(美国 Promega 公司)。转染 36 h 后收集 HeLa 细胞,使用双荧光报告基因分析试剂盒(美国 Promega 公司)在 GloMax 96 型荧光定量分析仪(美国 Promega 公司)上先后测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性,以萤火虫与海肾荧光素酶的活性比表示 KChIP2 启动子的活性。对每一种质粒进行 3 次独立的细胞转染实验,每次实验都一式三份平行进行,以 3 次实验数据的均值作为最终结果。

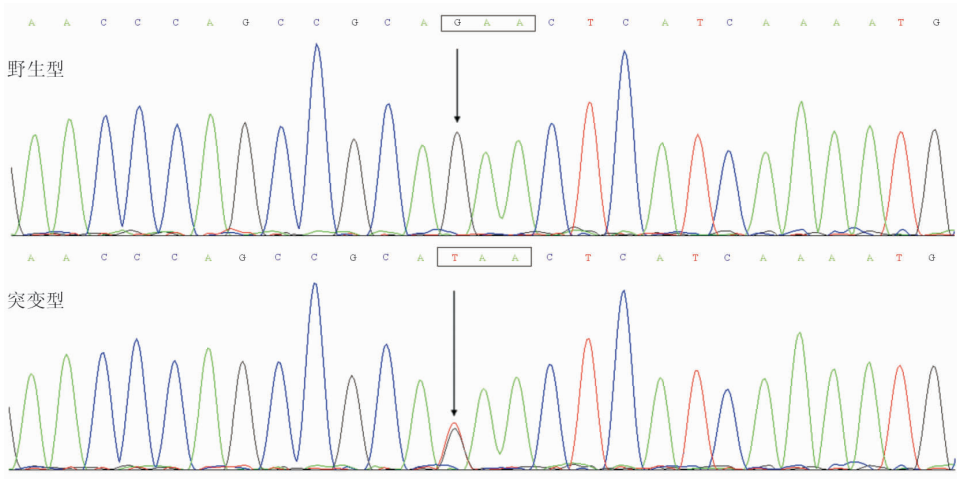
1.3 统计学分析

连续变量以均数 \pm 标准差表示,分类变量用绝对数或百分比表示。两组连续变量的比较使用非配对 Student's *t* 检验,两组分类变量的比较使用 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 *KLF15* 基因新突变

通过对 152 例特发性房颤患者的 *KLF15* 基因进行测序分析,在 1 例家族史阴性的 47 岁女性房颤患者发现了 1 种新的杂合突变,其 *KLF15* 基因编码核苷酸序列第 946 位的鸟嘌呤(G)变成胸腺嘧啶(T),即 c.946G>T 突变,相当于 *KLF15* 蛋白之氨基酸序列第 316 位编码谷氨酸(Glu)的密码子变为终止密码子(X),即 p. Glu316X 突变。对 206 名健康对照者的 *KLF15* 基因进行测序筛查没有发现基因突变。经过检索 SNP、HGMD、PubMed 和万方数据库,均未报道 *KLF15* 基因 c.946G>T 突变,显示本研究所识别的 *KLF15* 突变是新突变。该例房颤患者的 *KLF15* 基因 c.946G>T 杂合突变及其纯合野生型对照序列见图 1。

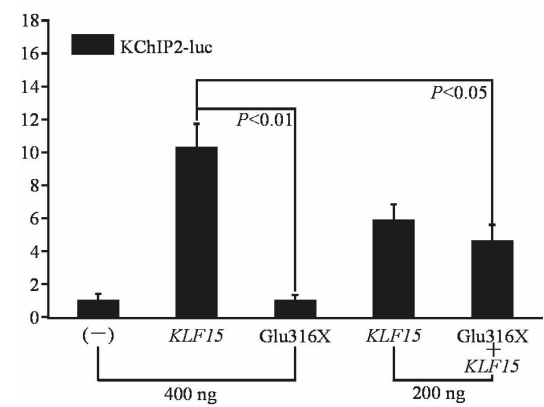


注:箭头所指分别为 *KLF15* 基因纯合野生型 G/G 序列和 c. 946G>T 杂合突变型 T/G

图 1 *KLF15* 基因 c. 946G>T 杂合突变及其纯合野生型序列

2.2 Glu316X 突变型 *KLF15* 功能丧失

如图 2 所示,同样剂量(400 ng)的野生型和 Glu316X-突变型 *KLF15*-pcDNA3. 1 质粒对 KChIP2 启动子的转录激活作用分别为(10.30 ± 1.45)倍和(1.05 ± 0.33)倍(纯合突变型与野生型比较; $t = 13.9265, P < 0.01$)。当 200 ng 的野生型 *KLF15*-pcDNA3. 1 单独转染或与 200 ng 的 Glu316X-突变型 *KLF15*-pcDNA3. 1 同时转染时,对 KChIP2 启动子所诱导的转录激活作用分别为(5.88 ± 0.99)倍和(4.72 ± 0.91)倍(杂合突变型与野生型比较; $t = 3.19, P = 0.03$)。



注:野生型 *KLF15*-pcDNA3. 1(*KLF15*)或 Glu316X-突变型 *KLF15*-pcDNA3. 1(Glu316X)单独或同时转染 HeLa 细胞,对 KChIP2 启动子驱动的荧光素酶的活性分析表明突变型 *KLF15* 的转录活性丧失

图 2 Glu316X 突变型 *KLF15* 功能丧失

3 讨论

本研究在 1 例特发性房颤患者中检测出 1 个新的 *KLF15* 基因杂合无义突变 c. 946G>T (p. Glu316X),

功能分析表明该突变导致 *KLF15* 基因功能完全丧失。因此,*KLF15* 基因功能缺失性突变 c. 946G>T (p. Glu316X)极有可能是该房颤患者的分子病因,不过该基因突变导致房颤的电生理机制仍需进一步研究。

KLF15 基因定位于人染色体 3q21. 3,编码一种由 416 个氨基酸所组成的转录因子蛋白,大量表达于心脏,激活多个重要的心脏靶基因,包括 *KChIP2*、*ACSS2*、*GLUT4*、*PDK4* 和 *FATP1*^[7,12-14]。既往研究发现,瞬时外向钾通道由 *KCND3* 基因编码的 α 亚单位 Kv4. 3 与 *KChIP2* 基因编码的 β 亚单位共组装而成,所产生的 Ito 与心肌动作电位的早期复极有关^[15]。尤其重要的是,作为产生 Ito 的关键调节亚单位,KChIP2 功能缺失足以导致 Ito 消失、心肌动作电位时程显著延长,从而形成了易发心律失常的基质^[16]。此外,作为 KChIP2 的上游调节者,*KLF15* 转录控制 KChIP2 的节律性表达,无论 *KLF15* 不足或过量均导致节律性 QT 变异消失、复极异常和心律失常易感性增加^[7]。因此,本研究所发现的 *KLF15* 基因功能丧失性突变可能通过抑制 Ito 而延长心房肌早期复极和动作电位有效不应期,进而诱发触发活动而导致房颤。

心脏能量代谢异常,尤其是葡萄糖和脂肪酸的代谢异常可以导致房颤^[17]。考虑到 *KLF15* 的下游靶基因 *ACSS2*、*GLUT4*、*PDK4* 和 *FATP1* 在葡萄糖和脂肪酸代谢方面的关键作用^[12-14],本研究发现的 *KLF15* 基因功能丧失性突变也可能通过下调这些靶基因、干扰心肌的能量代谢而诱发房颤。

近年来的研究表明,心房纤维化可通过阻断动

作电位传导、增加动作电位传导的各向异性而引发房颤^[18]。心房纤维化与多种致纤维化因子有关,包括结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血管紧张素 II 和血小板源生长因子等^[19]。实验研究证明,*KLF15* 反向调节 CTGF 和 TGFB1 这两大致纤维化因子的表达,甚至可以逆转心脏纤维化,改善心功能^[19]。在新生大鼠成纤维细胞中,*KLF15* 过表达可抑制基础性 CTGF 表达以及 TGFB1 诱导的 CTGF 表达;与此相反,在 *KLF15* 基因敲除小鼠心脏中,CTGF 表达增加,出现心脏胶原沉积^[19]。因此,本研究所发现的 *KLF15* 基因功能丧失性突变还可能通过增加的 CTGF 刺激心房纤维化而促发房颤。

本研究发现了一个新的特发性房颤致病基因并初步揭示了其致病机制,对房颤患者的遗传咨询和预后风险评估具有潜在的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Tian XT, Xu YJ, Yang YQ. Gender differences in arrhythmias; focused on atrial fibrillation[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2020, 13(1):85-96.
- [2] Qin D, Mansour MC, Ruskin JN, et al. Atrial fibrillation-mediated cardiomyopathy[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2019, 12(12):e007809.
- [3] Wijesurendra RS, Casadei B. Mechanisms of atrial fibrillation[J]. Heart, 2019, 105(24):1860-1867.
- [4] Lau DH, Nattel S, Kalman JM, et al. Modifiable risk factors and atrial fibrillation[J]. Circulation, 2017, 136(6):583-596.
- [5] Roselli C, Rienstra M, Ellinor PT. Genetics of atrial fibrillation in 2020: GWAS, genome sequencing, polygenic risk, and beyond[J]. Circ Res, 2020, 127(1):21-33.
- [6] Li N, Wang ZS, Wang XH, et al. A SHOX2 loss-of-function mutation underlying familial atrial fibrillation[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(13):1564-1572.
- [7] Jeyaraj D, Haldar SM, Wan X, et al. Circadian rhythms govern cardiac repolarization and arrhythmogenesis[J]. Nature, 2012, 483(7387):96-99.
- [8] Olesen MS, Refsgaard L, Holst AG, et al. A novel KCND3 gain-of-function mutation associated with early-onset of

persistent lone atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 2013, 98(3):488-495.

- [9] 董斌斌,刘兴元,杨奕清.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] 乔祺,杨晨曦,顾佳宁,等.散发性扩张型心肌病相关 ISL1 基因突变分析[J].国际心血管病杂志,2020,47(3):162-167.
- [11] 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.
- [12] Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H, et al. A Kruppel-like factor *KLF15* contributes fasting-induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene *AceCS2*[J]. J Biol Chem, 2004, 279(17):16954-16962.
- [13] Prosdocimo DA, Anand P, Liao X, et al. Kruppel-like factor 15 is a critical regulator of cardiac lipid metabolism[J]. J Biol Chem, 2014, 289(9):5914-5924.
- [14] Gray S, Feinberg MW, Hull S, et al. The Kruppel-like factor *KLF15* regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37):34322-34328.
- [15] Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(1):12-25.
- [16] Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, et al. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia[J]. Cell, 2001, 107(6):801-813.
- [17] Qiu J, Zhou S, Liu Q. Energy metabolic alterations in the progression of atrial fibrillation: Potential role of AMP-activated protein kinase as a critical regulator[J]. Int J Cardiol, 2016, 212:14-15.
- [18] Nattel S. Molecular and cellular mechanisms of atrial fibrosis in atrial fibrillation[J]. JACC Clin Electrophysiol, 2017, 3(5):425-435.
- [19] Wang B, Haldar SM, Lu Y, et al. The Kruppel-like factor *KLF15* inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(2):193-197.

(收稿:2020-09-24 修回:2020-11-30)

(本文编辑:丁媛媛)