

· 临床研究 ·

散发性先天性心脏病相关 *SMAD1* 基因新突变研究

陈春英 刘兴元 杨奕清

【摘要】 目的:研究散发性先天性心脏病相关 *SMAD1* 基因新突变。 **方法:**入选 202 例散发性先天性心脏病患儿和 238 名健康者,收集其临床资料和血标本并常规抽提基因组 DNA,测序分析 *SMAD1* 基因以发现致病新突变。克隆 *SMAD1* 基因,构建野生型 *SMAD1* 表达载体 *SMAD1*-pcDNA3.1,通过定点诱变产生突变型 *SMAD1*-pcDNA3.1,转染 COS7 细胞,应用双荧光报告基因分析试剂研究突变的功能特性。 **结果:**在 1 例散发性先天性右心室双流出道合并室间隔缺损患儿中发现 *SMAD1* 基因新突变,即 NM_005900.3:c.381T>A; p.(Cys127*) 突变。该突变不存在于 238 名健康者中。报告基因分析表明突变型 *SMAD1* 对靶基因 *TBX20* 的转录激活作用丧失。 **结论:** *SMAD1* 基因功能丧失性突变可能是部分散发性先天性右心室双流出道合并室间隔缺损的分子病因,这对先天性心脏病的精准医学防治具有潜在意义。

【关键词】 先天性心脏病;遗传学;转录因子; *SMAD1* 基因;报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.06.015

Role of a new *SMAD1* mutation in sporadic congenital heart disease CHEN Chunying¹, LIU Xingyuan¹, YANG Yiqing². 1. Department of Pediatrics, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065; 2. Department of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, and Central Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

【Abstract】 Objective: To investigate the possible role of a new *SMAD1* mutation in sporadic congenital heart disease. **Methods:** 202 children with sporadic congenital heart disease and 238 healthy subjects were included in this study. Clinical data and blood samples were collected, and genomic DNA was isolated from the blood leucocytes of each study participant. Sequencing analysis of the *SMAD1* gene was carried out to identify a new mutation underpinning sporadic congenital heart disease. The *SMAD1* gene was cloned and its wild-type expression vector *SMAD1*-pcDNA3.1 was constructed. The mutant-type *SMAD1*-pcDNA3.1 was generated through site-directed mutagenesis. COS7 cells were transfected with expression vectors, and the functional characteristics of mutant-type *SMAD1* were explored with dual-luciferase reporters. **Results:** A new *SMAD1* mutation, NM_005900.3: c.381T>A; p.(Cys127*), was identified in a child suffering from congenital double outlet of the right ventricle and ventricular septal defect. In contrast, it was not detected in healthy subjects. Reporter analyses demonstrated that Cys127*-mutant *SMAD1* lost the ability to transcriptionally activate its target gene *TBX20*. **Conclusion:** *SMAD1* loss-of-function mutation is likely to be the molecular mechanism predisposing to sporadic congenital double outlet of the right ventricle and ventricular septal defect in a subset of patients, implying its potential implication for precise prophylaxis and treatment of congenital heart disease.

【Key words】 Congenital heart disease; Genetics; Transcription factor; *SMAD1*; Reporter gene analysis

基金项目:上海市自然科学基金(16ZR1432500)

作者单位:200065, 同济大学医学院附属同济医院儿科(陈春英,刘兴元);200240, 复旦大学附属上海市第五人民医院心内科、心血管研究室、中心实验室(杨奕清)

通信作者:刘兴元, E-mail: liuxingyuan402@tongji.edu.cn

先天性心脏病是人类最常见的出生畸形,在活产新生儿中的发病率约为 1%,可导致肺动脉高压、中枢神经系统发育延迟、脑损伤、心力衰竭、感染性心内膜炎以及致命性室性心律失常等严重并发症,甚至可致心源性猝死^[1-2]。遗传学研究表明先天性心脏病主要是由遗传异常所致,除染色体异常和拷贝数变异外,目前已经发现了 100 多个先天性心脏病致病基因,包括可导致家族性先天性心脏病的心脏转录因子基因 *SMADI*^[3]。由于先天性心脏病具有显著的遗传异质性,且大多数先天性心脏病为散发^[4-5],因此,有必要进一步研究 *SMADI* 基因与散发性先天性心脏病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2016 年 3 月至 2021 年 10 月,入选 202 例汉族散发性患儿为病例组,其中男性 115 例,女性 87 例,年龄为 1~13 岁,平均年龄为 (5±4) 岁。对照组为 238 名汉族健康志愿者,其中男性 136 名,女性 102 名,年龄为 1~13 岁,平均年龄为 (5±3) 岁。所有研究对象均经过详细临床分析,包括家族史及病史回顾、体格检查和多普勒彩色心脏超声检查。根据阴性家族史、阳性心脏超声检查结果或心脏手术记录,诊断散发性先天性心脏病^[6]。病例组和对照组均无先天性心脏病家族史,也均无可诱发先天性心脏病的环境危险因素。本研究遵循医学伦理学规范,并获得同济大学医学院附属同济医院伦理委员会的批准。经研究对象知情同意后,收集其临床资料和全血标本,用基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)常规纯化基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 *SMADI* 基因的扩增 通过聚合酶链反应(PCR)扩增 *SMADI* 基因全部编码外显子、剪接位点以及部分 5' 和 3' 端非翻译区,引物 DNA 序列见参考文献[3]。以每一研究对象的基因组 DNA 为模板,应用合成的上述特异性 *SMADI* 扩增引物及热启动 DNA 聚合酶试剂盒(德国 Qiagen 公司),在 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上对 *SMADI* 基因片段进行扩增。PCR 混合物的总体积为 50 μL,包括 5×Q 溶液 10 μL、双蒸水 26.5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL、上下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μL、10×PCR 缓冲液 5 μL、基因组 DNA (50 ng/μL) 2 μL 和热启动 DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL。PCR 的条件设置见参考文献[7]:95℃预变

性 15 min,随即进入 38 个热循环,每个热循环包括 94℃变性 30 s、62℃退火 30 s 和 72℃延伸 1 min,最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后割胶回收并用凝胶 DNA 提取试剂盒(美国 Bio-Tek 公司)进行纯化。

1.2.2 *SMADI* 基因的 Sanger 测序分析 以上述纯化的 PCR 产物作为模板,使用 1 条 *SMADI* 基因扩增引物及 DNA 循环测序试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)在 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行 Sanger 测序反应。测序反应混合物的体积为 20 μL,其中 *SMADI* 基因 DNA 片段 (30 ng/μL) 2 μL、预混合液 8 μL、正向引物 (2 μmol/L) 2 μL、双蒸水 8 μL。测序反应的条件^[7]:30 个循环,每个热循环包括 95℃变性 20 s、50℃退火 15 s 和 60℃延伸 1 min。测序反应产物经纯化回收后在 DNA 分析仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上进行 DNA 测序。将所测出的 *SMADI* 基因序列与核苷酸数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>)中的 *SMADI* 基因序列(登陆号:NM_005900.3)进行比较分析,以发现 *SMADI* 基因突变。如果识别出 *SMADI* 基因突变,就测序分析 238 名健康对照者的 *SMADI* 基因,同时检索 HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)、PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) 和万方数据库 (<https://g.wanfangdata.com.cn/index.html>),以核实所发现的 *SMADI* 基因突变是否是新突变。

1.2.3 *SMADI* 基因突变的致病性模拟分析 通过在线计算机软件 MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) 预测分析 *SMADI* 基因突变是否具有致病性。

1.2.4 *SMADI* 基因突变体的功能研究 野生型 *SMADI* 的表达载体 *SMADI*-pcDNA3.1 及其靶基因 *TBX20* 启动子驱动萤火虫荧光素酶 (*luc*) 表达的报告基因表达载体 *TBX20*-*luc* 的构建可见参考文献[3]。以野生型 *SMADI*-pcDNA3.1 为模板,应用 1 对长 31 个碱基的互补引物(以突变点为中心)和定点诱变试剂盒(美国 Stratagene 公司),通过 PCR 获得突变型 *SMADI*-pcDNA3.1。应用 DNA 酶 Dpn I (美国 NEB 公司)切除野生型 *SMADI*-pcDNA3.1 模板并经过 DNA 测序证实获得序列正确的突变型 *SMADI*-pcDNA3.1。COS7 细胞培养

及多种表达载体共转染的方法见参考文献 [3]。质粒转染后 48 h 收集、裂解 COS7 细胞。用双报告基因（萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶表达基因）分析试剂盒（美国 Promega 公司）在荧光分析仪（美国 Promega 公司）上定量分析细胞裂解液中荧光素酶的活性。以 2 种荧光素酶的活性之比（萤火虫荧光素酶活性 / 海肾荧光素酶活性）表示靶基因 *TBX20* 启动子的转录活性^[3]。

1.3 统计学分析

2 组连续变量如入选研究对象的年龄、靶基因 *TBX20* 启动子的转录活性等的比较用非配对 Student's *t* 检验；分类变量如入选研究对象的种族、性别等的比较用 Pearson's χ^2 检验或 Fisher's 精确概率检验。以双侧检验概率值 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

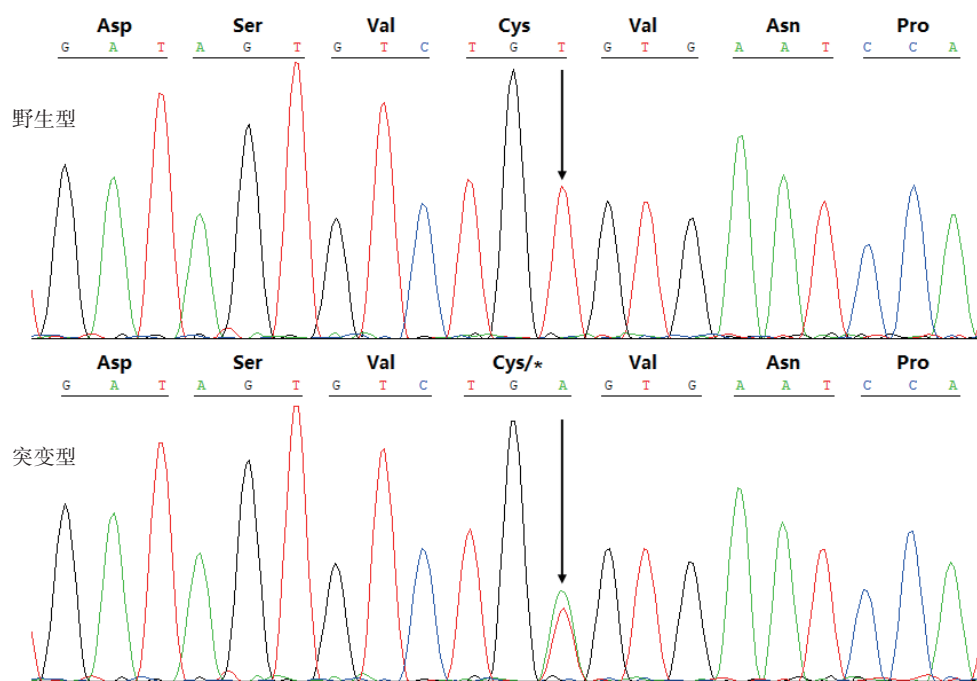
2.1 鉴别出 *SMAD1* 基因新突变

本研究病例组 ($n=202$) 与对照组 ($n=238$)

入选者均为中国大陆汉族人，均无先天性心脏病家族史，两组间性别无统计学差异（经 Pearson's χ^2 检验 $P > 0.05$ ）和年龄（经 Student's *t* 检验 $P > 0.05$ ）也没有统计学差异。通过对 202 例散发性先天性心脏病患儿的 *SMAD1* 基因进行 Sanger 测序分析，在其中 1 例 3 岁的男性先天性右心室双流出道合并室间隔缺损患儿检测出 1 种 *SMAD1* 基因杂合无义突变，即 NM_005900.3: c.381T>A ; p.(Cys127*) 突变。该 *SMAD1* 基因突变不存在于 238 名健康儿童，在 HGMD、SNP、PubMed 和万方数据库也均无报道，表明该 *SMAD1* 基因突变是 1 个新突变。该例先天性右心室双流出道合并室间隔缺损患儿的 *SMAD1* 基因 c.381T>A 杂合突变及其纯合野生型对照 DNA 序列见图 1。

2.2 *SMAD1* 基因新突变 c.381T>A 有致病性

SMAD1 基因新突变 c.381T>A 被在线软件 MutationTaster 预测为有致病性，这种预测的正确率约为 1 (>0.9999)。



注：箭头指向 *SMAD1* 基因的 c.381T>A 杂合变异型 C/T 和纯合野生型 T/T

图1 *SMAD1* 基因的 c.381T>A 突变（杂合子）及其野生型（纯合子）对照 DNA 序列

2.3 Cys127*-突变型 *SMAD1* 对靶基因 *TBX20* 的转录激活功能丧失

在转染了多种基因表达载体的 COS7 细胞，400 ng 的野生型 *SMAD1*-pcDNA3.1 和等量 (400 ng) 的 Cys127*-突变型 *SMAD1* 对靶基因 *TBX20* 启动子的转录激活效应分别约为 11 倍

(10.9328 ± 1.63) 和 1 倍 (1.14 ± 0.41)，2 组之间具有显著性差异 ($t=10.02$, $P=0.0006$)；而在同时转染了 200 ng 的野生型 *SMAD1*-pcDNA3.1 和等量 (200 ng) 的 Cys127*-突变型 *SMAD1* 时，所诱导的转录激活效应约为 6 倍 (5.80 ± 0.71)，显著低于 400 ng 的野生型 *SMAD1*-pcDNA3.1 所诱

导的转录激活作用, 2 组之间具有显著性差异 ($t=4.96$, $P=0.007$)。

3 讨论

本研究在 1 例散发性先天性心脏病(右心室双流出道合并室间隔缺损)患儿中发现了 1 种新的 *SMAD1* 基因杂合无义突变, 即 NM_005900.3: c.381T>A; p.(Cys127*) 突变。该 *SMAD1* 基因突变不存在于 238 名健康儿童, 在 HGMD、SNP、PubMed 和万方数据库也均无报道。在线计算机软件 MutationTaster 模拟分析结果提示该突变具有致病性。报告基因分析表明 Cys127*- 突变型 *SMAD1* 对靶基因 *TBX20* 启动子的转录激活作用丧失, 而 *TBX20* 功能障碍已经被证实可导致先天性心脏病^[3]。因此, *SMAD1* 基因新突变 c.381T>A 或 p.(Cys127*) 很可能是该例散发性先天性心脏病(右心室双流出道合并室间隔缺损)患儿的分子病因。

人类 *SMAD1* 基因定位于 4 号染色体 4q31.21, 编码一种属于 SMAD 超家族的转录因子, 由 465 个氨基酸残基组成^[3]。*SMAD1* 在整个胚胎发育期大量表达于心血管系统, 可单独或与 *TBX20* 或 *MYOCD* 协同转录激活对心脏形态发育具有关键作用的靶基因(如 *TBX20*、*NKX2-5*、*TCTC1* 和 *MYH6*)^[8-10]。不仅如此, 目前已经发现 *TBX20*、*NKX2-5*、*TCTC1*、*MYH6* 和 *MYOCD* 基因功能缺失性突变均可导致先天性心脏病^[11-15]。本研究发现 *SMAD1* 基因功能缺失性新突变可导致右心室双流出道合并室间隔缺损。这些研究结果显示 *SMAD1* 基因单倍型不足是人类先天性心脏病的分子机制之一。

既往的实验动物研究发现, 在胚胎发育期间, *SMAD1* 可以在多种动物(包括小鼠、大鼠、蟾蜍和斑马鱼)的心血管系统大量表达, 通过调节细胞生长、增殖、分化、凋亡, 在心血管形态发育方面发挥重要作用^[16-17]。在模型小鼠, *Smad1* 基因敲除可导致胚胎死亡, 主要原因在于胚胎不能着床于胎盘, 胚胎中原始生殖细胞生成障碍及数量显著减少; 而 *Smad1* 基因敲除杂合子小鼠发育无明显异常, 这很可能与属于同一基因族的 *Smad5* 和 *Smad8* 基因的代偿作用有关, 因为 *Smad5* 和 *Smad8* 基因的表达部位和蛋白功能特点与 *Smad1* 的相似^[18-19]。进一步研究发现, 尽管 *Smad1* 基因或 *Smad5* 基因单独敲除的杂合子小鼠发育正常, 但 *Smad1* 基因和 *Smad5* 基因联合敲除的杂合子小鼠在胚胎期死亡,

主要是因为小鼠胚胎心脏环化和偏侧化障碍^[19]。此外, 内皮细胞或平滑肌细胞特异性敲除 *Smad1* 基因小鼠可发生肺动脉高压、右心室肥厚和肺小动脉壁厚度增加^[20]。这些实验动物研究结果支持 *SMAD1* 基因功能缺失性突变导致人类先天性心脏病。

值得注意的是, *SMAD1* 基因功能缺失性突变此前已经被发现可导致家族性动脉导管未闭、室间隔缺损和肺动脉狭窄^[3]。本研究识别出 *SMAD1* 基因功能缺失性新突变可导致散发性右心室双流出道合并室间隔缺损, 从而扩大了先天性心脏病相关 *SMAD1* 基因突变谱。

总之, 本研究识别出了 1 种新的 *SMAD1* 基因功能缺失性突变可导致右心室双流出道和室间隔缺损, 这对先天性心脏病的早期精准预防有潜在的临床意义。

参 考 文 献

- [1] Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2021, 143(8):e254-e743.
- [2] Zhang Y, Sun YM, Xu YJ, et al. A new *TBX5* loss-of-function mutation contributes to congenital heart defect and atrioventricular block[J]. Int Heart J, 2020, 61(4):761-768.
- [3] Wang Z, Qiao XH, Xu YJ, et al. *SMAD1* loss-of-function variant responsible for congenital heart disease[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022:9916325.
- [4] Martin LJ, Benson DW. Focused strategies for defining the genetic architecture of congenital heart defects[J]. Genes (Basel), 2021, 12(6):827.
- [5] Diab NS, Barish S, Dong WL, et al. Molecular genetics and complex inheritance of congenital heart disease[J]. Genes (Basel), 2021, 12(7):1020.
- [6] Sun RR, Liu M, Lu L, et al. Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 72(3):857-860.
- [7] 乔祺, 杨晨曦, 顾佳宁, 等. *KLF15* 基因突变导致心房颤动的机制[J]. 国际心血管病杂志, 2021, 48(1):53-57.
- [8] Callis TE, Cao DS, Wang DZ. Bone morphogenetic protein signaling modulates myocardin transactivation of cardiac genes[J]. Circ Res, 2005, 97(10):992-1000.
- [9] Singh R, Horsthuis T, Farin HF, et al. *Tbx20* interacts with smads to confine *tbx2* expression to the atrioventricular canal[J]. Circ Res, 2009, 105(5):442-452.
- [10] Mandel EM, Kaltenbrun E, Callis TE, et al. The BMP pathway acts to directly regulate *Tbx20* in the developing heart[J]. Development, 2010, 137(11):1919-1929.
- [11] Kirk EP, Sunde M, Costa MW, et al. Mutations in cardiac T-box factor gene *TBX20* are associated with diverse cardiac

- pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy[J]. Am J Hum Genet, 2007, 81(2):280-291.
- [12] Schott JJ, Benson DW, Basson CT, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5[J]. Science, 1998, 281(5373):108-111.
- [13] Granados-Riveron JT, Ghosh TK, Pope M, et al. Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(20):4007-4016.
- [14] Greenway SC, McLeod R, Hume S, et al. Exome sequencing identifies a novel variant in ACTC1 associated with familial atrial septal defect[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(2):181-187.
- [15] Ransom JF, King IN, Garg V, et al. A rare human sequence variant reveals myocardin autoinhibition[J]. J Biol Chem, 2008, 283(51):35845-35852.
- [16] Attisano L, Lee-Hoeflich ST. The smads[J]. Genome Biol, 2001, 2(8):REVIEWS3010.
- [17] Prall OWJ, Menon MK, Solloway MJ, et al. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation[J]. Cell, 2007, 128(5):947-959.
- [18] Tremblay KD, Dunn NR, Robertson EJ. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation[J]. Development, 2001, 128(18):3609-3621.
- [19] Arnold SJ, Maretto S, Islam A, et al. Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo[J]. Dev Biol, 2006, 296(1):104-118.
- [20] Han C, Hong KH, Kim YH, et al. SMAD1 deficiency in either endothelial or smooth muscle cells can predispose mice to pulmonary hypertension[J]. Hypertension, 2013, 61(5):1044-1052.

(收稿:2022-04-02 修回:2022-08-02)

(本文编辑:丁媛媛)

**To cure sometimes,
to relieve often,
to comfort always.**

—Edward Livingston Trudeau

有时，去治愈，
常常，去帮助，
总是，去安慰。

——爱德华·利文斯顿·特鲁多

