

## · 临床研究 ·

孤立性心房颤动致病基因 *TBX20* 新突变的发现及功能研究

张道良 李宁 姜伟峰 吴绍辉 仇兴标 杨奕清

**【摘要】 目的:**寻找孤立性心房颤动(房颤)致病基因 *TBX20* 新突变并研究其功能。 **方**  
**法:**测序分析 182 例孤立性房颤患者和 236 名无房颤对照者的 *TBX20* 基因,以发现新的致房  
颤突变。克隆人 *TBX20* 基因,构建野生型 *TBX20* 表达质粒,通过定点诱变制备突变型 *TBX20*  
表达质粒,借助脂质体将表达质粒转染 HeLa 细胞,应用双荧光素酶报告基因分析系统研究  
突变体的功能特性。 **结果:**在 1 例散发性孤立性房颤患者中发现 *TBX20* 基因新突变,即  
NM\_001077653.2:c.706A>T;p.(Lys236\*) 突变。该突变不存在于其他孤立性房颤患者和对  
照者。功能研究显示突变型 *TBX20* 对靶基因 *KCNH2* 的转录激活作用丧失。 **结论:** *TBX20*  
基因功能障碍可能是部分房颤患者的分子病因,这对房颤的精准防治有潜在临床意义。

**【关键词】** 心房颤动;分子遗传学;转录因子; *TBX20* 基因;报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2024.02.013

**Identification and functional investigation of a new *TBX20* mutation contributing to lone atrial fibrillation** ZHANG Daoliang<sup>1</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, JIANG Weifeng<sup>3</sup>, WU Shaohui<sup>3</sup>, QIU Xingbiao<sup>3</sup>, YANG Yiqing<sup>4</sup>. 1. Cardiac Arrhythmia Center, Shenzhen Hospital of Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen 518057; 2. Department of Cardiology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; 3. Department of Cardiology, Shanghai Chest Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030; 4. Department of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, and Central Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

**【Abstract】 Objective:** To identify and functionally investigate a new *TBX20* mutation underlying lone atrial fibrillation. **Methods:** Sequencing assay of *TBX20* was performed in 182 patients with lone atrial fibrillation and 236 control individuals without atrial fibrillation to identify a new mutation accountable for atrial fibrillation. The human *TBX20* gene was cloned with its wild-type expression plasmid constructed. The mutant-type *TBX20* expression plasmid was produced through site-directed mutagenesis. Hela cells were transfected using multiple expression plasmids with the help of lipofectamine and the functional characteristics of the mutant-type *TBX20* were explored by utilizing a dual-reporter assay system. **Results:** In one patient suffering from sporadic lone atrial fibrillation, a new *TBX20* mutation, NM\_001077653.2:c.706A>T; p.(Lys236\*), was found, which was neither observed in the other patients with lone atrial fibrillation nor detected in the control subjects. Further functional investigation revealed that the mutant-type *TBX20* lost the transactivation effect on its target gene *KCNH2*. **Conclusion:** Dysfunctional *TBX20* is likely to be a molecular cause of atrial fibrillation in a minority of cases, implying its potential clinical significance for the precise prophylaxis and therapy of atrial fibrillation.

基金项目:国家自然科学基金(82070331);广东省引进创新创业团队项目(2019ZT08Y481)

作者单位:518057 中国医学科学院阜外医院深圳医院心律失常中心(张道良);200062 上海中医药大学附属普陀医院心内科(李宁);200030 上海交通大学医学院附属胸科医院心内科(姜伟峰,吴绍辉,仇兴标);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:张道良, E-mail: xkzhangdaoliang@126.com

【Key words】 Atrial fibrillation; Molecular genetics; Transcriptional factor; *TBX20*; Report gene analysis

心房颤动（房颤）在一般人群中的发病率高达 2%，可诱发智力下降甚至痴呆、血栓栓塞性卒中、急性肾损伤或慢性肾病、急性心肌梗死、心力衰竭、室性心律失常等并发症，甚至心源性死亡<sup>[1]</sup>。临床遗传研究表明，遗传缺陷是部分房颤的重要分子病因<sup>[2]</sup>。目前，除了已发现的 140 多个房颤相关遗传位点外，还发现 60 多个房颤相关基因，包括编码心脏离子通道、缝隙连接通道、心脏结构蛋白和转录因子蛋白的基因<sup>[1-2]</sup>。近年来研究发现，心脏转录因子 *TBX20* 可以转录激活调节多个房颤致病基因的表达，包括 *GJA5*、*NPPA*、*GJC1* 和 *KCNH2* 基因等<sup>[1-2]</sup>。本研究将 *TBX20* 基因作为房颤的候选致病基因进行研究。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取 2015 年 3 月至 2017 年 12 月就诊于上海交通大学医学院附属胸科医院的 182 例汉族孤立性房颤患者作为病例组，其中男性 102 例，女性 80 例，年龄 32~56 岁，平均年龄（53±6）岁。选取 236 名汉族无房颤健康体检者作为对照组，其中男性 131 名，女性 105 名，年龄 35~57 岁，平均年龄（53±7）岁。2 组入选者均经过个人史及家族史回顾、仔细体检、标准心电图检查和心脏超声检查。孤立性房颤的诊断根据国际通用的房颤患者管理指南<sup>[3]</sup>。病例组中 35 例（约 19%）有房颤家族史，对照组中均无房颤家族史。2 组入选对象均无明确的可诱发房颤的环境因素。本研究遵守医学伦理学规范，并经过上海交通大学医学院附属胸科医院伦理委员会的核准。经研究对象知情同意后，收集其临床信息和外周静脉血标本，常规纯化、-20℃冰箱保存其基因组 DNA。

### 1.2 方法

1.2.1 人 *TBX20* 基因的体外扩增 使用聚合酶链反应（PCR）仪（美国 Bio-Rad 公司）扩增人 *TBX20* 基因的编码区和剪接位点序列，引物序列见参考文献 [4]。以每个入选对象的基因组 DNA 作模板，应用 AccuPrime™ Taq 高保真 DNA 聚合酶试剂盒（美国 Invitrogen 公司）及化学合成的上述人 *TBX20* 基因的扩增引物，在 PCR 仪（美

国 Bio-Rad 公司）上对人 *TBX20* 基因各片段进行体外扩增。PCR 混合液的总体积为 50 μL，其中包括 10×AccuPrime™ PCR Buffer II（内含 dGTP、dATP、dTTP 和 dCTP 各 2 mmol/L）5.0 μL、正、反向引物（10 μmol/L）各 1.0 μL、AccuPrime™ Taq 高保真 DNA 聚合酶（5 U/μL）0.2 μL、基因组 DNA（40 μg/L）2.0 μL、高压灭菌蒸馏水 40.8 μL。PCR 的温度循环条件设置为：94℃预变性 20 s，随即进入温度循环 36 次，每次包括 94℃变性 20 s、62℃退火 30 s 和 68℃延伸 1 min，终末 68℃延伸 8 min。PCR 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳（80V、45 min）分离后，切胶回收并用 GeneJET 凝胶 DNA 回收试剂盒（美国 Thermo Scientific 公司）进行纯化。

1.2.2 人 *TBX20* 基因的 PCR 测序分析 以上述纯化的 PCR 产物为模板，使用 1 条人 *TBX20* 基因扩增引物（正向或反向）和 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒（美国 Applied Biosystems 公司）在 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）上进行测序 PCR。测序 PCR 混合液的体积定为 20 μL，其中预混合液 Premix 8.0 μL、正向或反向引物（2 μmol/L）2.0 μL、人 *TBX20* 基因片段 DNA（30 μg/L）2.0 μL、高压灭菌蒸馏水 8.0 μL。测序 PCR 的条件如文献 [5] 所述：共 30 次循环，每 1 次循环包括 95℃变性（20 s）、50℃退火（15 s）及 60℃延伸（1 min）。测序 PCR 产物使用 BigDye XTerminator 纯化试剂盒（美国 Applied Biosystems 公司）进行纯化。纯化后的测序 PCR 产物在遗传分析仪（美国 Applied Biosystems 公司）上进行凝胶电泳测序。将测出的人 *TBX20* 基因序列与核苷酸数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>）中的人 *TBX20* 基因序列（登陆号：NM\_001077653.2）进行比对分析以发现人 *TBX20* 基因突变。如识别出人 *TBX20* 基因突变，则 PCR 测序分析 236 名对照者的 *TBX20* 基因，并且在线检索单核苷酸多态性（SNP）数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>）和 gnomAD 数据库（<http://gnomad-sg.org/>）以明确所发现的人 *TBX20* 基因突变的新颖性。

1.2.3 构建人 *TBX20* 基因的真核细胞表达质

粒 野生型人 *TBX20* 基因的真核细胞表达质粒 *TBX20*-pcDNA3.1 的构建见参考文献 [4]。以野生型人 *TBX20* 基因的真核细胞表达质粒 *TBX20*-pcDNA3.1 作模板,应用定位诱变试剂盒(美国 Invitrogen 公司)和 1 对互补引物(长度为 31 个碱基、突变点在中心),通过 PCR 生成 Lys236\*- 突变型 *TBX20*-pcDNA3.1。用 DNA 酶 Dpn I (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)切除野生型 *TBX20*-pcDNA3.1 模板,并通过测序证实获得 Lys236\*- 突变型 *TBX20*-pcDNA3.1。人 *KCNH2* 基因启动子驱动萤火虫荧光素酶表达的 *KCNH2*-luc 质粒的构建见参考文献 [1]。

1.2.4 人 *TBX20* 基因突变体的功能研究 将 HeLa 细胞接种于 24 孔细胞培养板,置于细胞培养箱常规培养。借助 Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司)将多种表达质粒共转染入 HeLa 细胞,转染方法见参考文献 [1]。每次转染实验用 100 ng 的空 pcDNA3.1 质粒(-)或 100 ng 的野生型人 *TBX20*-pcDNA3.1 表达质粒(WT)或 100 ng 的 Lys236\*- 突变型人 *TBX20* 表达质粒(Lys236\*)或 50 ng 的空质粒+50 ng 的 WT 或 50 ng 的空质粒+50 ng 的 Lys236\*,同时共转染 1.0  $\mu$ g 的人 *KCNH2*-luc 和 40 ng 的 pRL-TK 质粒(美国 Promega 公司)。使用内对照海肾荧光素酶表达质粒 pRL-TK 平衡每次转染的效率。HeLa 细胞转染质粒后 48 h 进行收集并裂解。借助荧光定量分析仪(瑞士 Tecan 公司),

应用双荧光素酶(双报告基因)分析试剂盒(美国 Promega 公司)分析 HeLa 细胞裂解液中 2 种荧光素酶的活性,以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示靶基因 *KCNH2* 启动子的转录活性。

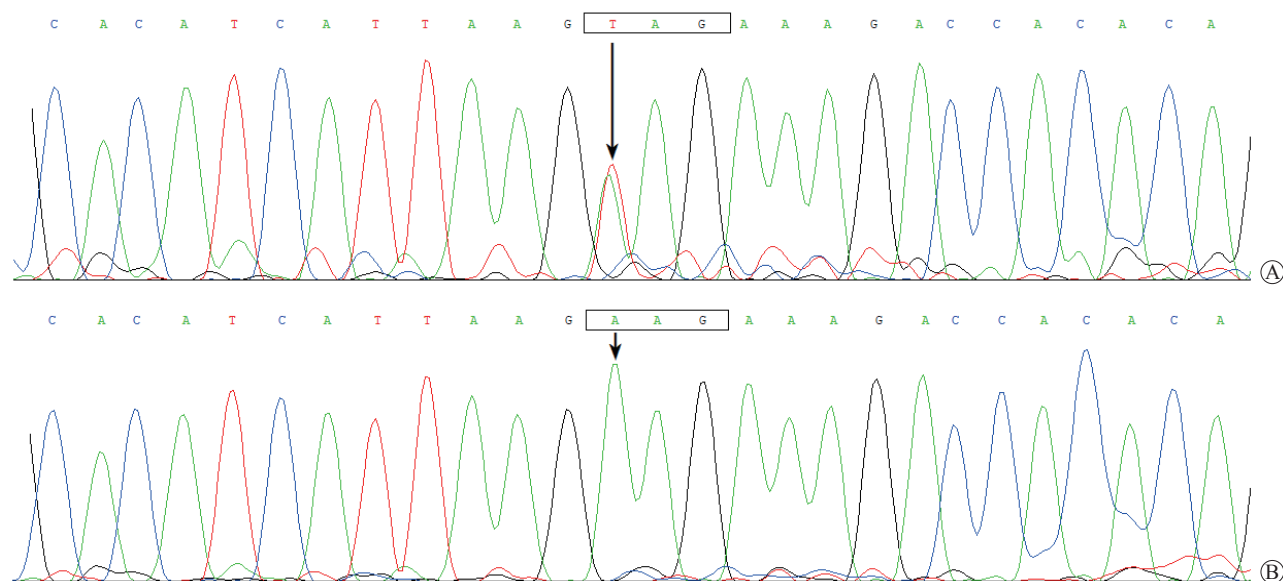
### 1.3 统计学分析

连续变量参数如研究对象的年龄、靶基因人 *KCNH2* 启动子的转录活性等以均数 $\pm$ 标准差表示;分类变量参数如研究对象的性别、种族等用数字或百分比表示。2 组连续变量参数的比较用 Student's *t* 检验(非配对);2 组分类参数的比较用 Fisher's 精确检验。双侧检验值  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 发现人 *TBX20* 基因新突变

本研究通过对 182 例孤立性房颤患者的 *TBX20* 基因进行测序分析,在 1 例 51 岁的男性散发性孤立性房颤患者中发现了 1 个 *TBX20* 基因杂合无义突变,即 NM\_001077653.2:c.706A>T;p.(Lys236\*)突变。该 *TBX20* 基因突变在其他 181 例孤立性房颤患者和 236 名无房颤对照者中均未检测出,在 SNP 或 gnomAD 数据库中也尚未报道,表明该 *TBX20* 基因突变是新发现的突变。该例散发性孤立性房颤患者的 *TBX20* 基因 c.706A>T 杂合突变和 1 名无房颤对照者的纯合野生型对照 DNA 序列见图 1。



注:箭头指向为患者 *TBX20* 基因 c.706A>T 杂合突变 T/A (1A) 和对照者的纯合野生型 A/A (1B)

图1 人 *TBX20* 基因 c.706A>T 杂合突变及纯合野生型对照 DNA 序列



## 2.2 Lys236\*-突变型人*TBX20*对靶基因*KCNH2*的转录激活作用丧失

在转染了多种基因表达质粒的 HeLa 细胞中, 100 ng 的 *TBX20* 和等量 (100 ng) 的 Lys236\* 对人靶基因 *KCNH2* 启动子的转录激活效应分别约为 36 倍 ( $36.13 \pm 2.20$ ) 和 2 倍 ( $2.29 \pm 0.67$ ), 2 组之间的转录激活效应差异有统计学意义 ( $t=25.48$ ,  $P<0.01$ ); 而在同时转染 50 ng 的 *TBX20* 和等量 (50 ng) 的 Lys236\* 时, 所产生的转录激活效应约为 18 倍 ( $17.71 \pm 1.91$ ), 显著低于 100 ng 的 *TBX20* 对人靶基因 *KCNH2* 启动子的转录激活效应, 2 组之间差异有统计学意义 ( $t=10.94$ ,  $P<0.01$ )。

## 3 讨论

本研究在 1 例男性散发性孤立性房颤患者中发现了 1 种新的 *TBX20* 基因杂合无义突变, 即 NM\_001077653.2:c.706A>T;p.(Lys236\*) 突变。该 *TBX20* 基因突变在 236 名无房颤对照者中未检测出, 在 SNP 或 gnomAD 数据库中也尚未报道。基于双报告基因定量分析表明 Lys236\*- 突变型 *TBX20* 对靶基因 *KCNH2* 启动子的转录激活作用丧失, 而 *KCNH2* 基因变异已被证实可导致多种类型的心律失常, 包括房颤、短 QT 综合征和长 QT 综合征<sup>[6-10]</sup>。因此, *TBX20* 基因突变极有可能是该例孤立性房颤患者的分子病因。

人 *TBX20* 基因定位于 7 号染色体 7p15-7p14 区域, 编码 1 种由 447 个氨基酸组成的含有 T-box 的转录因子, 属于 T-box 家族的 5 号成员<sup>[1]</sup>。研究发现, *TBX20* 大量表达于胚胎发育期的心脏, 且在出生后及成年人的心脏中持续大量表达, 对心血管正常发育和适应性重构具有关键调控作用<sup>[11]</sup>。实验证实, *TBX20* 可以单独调节或与其转录合作伙伴如 *TBX5*、*NKX2.5*、*GATA5* 或 *GATA4* 一起协同调节具有重要作用的心血管相关靶基因如 *GJA5*、*NPPA*、*GJC1* 和 *KCNH2* 的表达, 从而影响心血管发育和重构<sup>[1,12-14]</sup>。此外, 已发现 *GJA5*、*NPPA*、*GJC1*、*KCNH2*、*TBX5*、*NKX2.5*、*GATA5* 和 *GATA4* 基因突变均可诱发房颤<sup>[1]</sup>。本研究在孤立性房颤患者中发现的 *TBX20* 基因功能丧失性突变, 表明人 *TBX20* 基因单倍型不足是房颤发生的分子病理机制之一。

*TBX20* 基因功能障碍诱发房颤可部分归因于心脏结构和电生理异常。既往研究证实, *TBX20* 基因在胎心发育、内稳态、成年心脏功能和病理

生理适应, 以及心脏电生理尤其是心脏传导系统功能等方面具有重要作用<sup>[11]</sup>。心脏传导系统发育不良或稳态失衡可致传导系统功能障碍, 从而触发心律失常甚至猝死<sup>[1,11,15]</sup>。在成年小鼠, 特异性敲除心肌 *Tbx20* 基因可导致心脏扩大、收缩功能丧失、心脏传导速度降低和严重心律失常<sup>[16-17]</sup>。此外, 已有研究表明 *TBX20* 可以选择性地调节 *KCNH2* 基因的表达<sup>[1,12]</sup>。*KCNH2* 基因编码 Kv 11.1 (hERG), 形成快速激活延迟整流 K<sup>+</sup> 通道  $\alpha$  亚单位 (辅助性  $\beta$  亚单位为 *KCNE2* 基因编码), 而快速激活延迟整流 K<sup>+</sup> 通道所产生的心肌动作电位 3 期复极电流是心肌复极的主要电流之一<sup>[17]</sup>。Caballero 等<sup>[12]</sup> 发现, *TBX20* 基因功能丧失可降低 hERG 的表达, 减少心肌内向整流 K<sup>+</sup> 电流, 导致心肌动作电位时程延长。经典心脏电生理理论认为, 触发和折返是房颤的主要电生理机制, 而触发活动可由心肌动作电位时程延长所致的早期后除极所引发<sup>[18]</sup>, 因此, *TBX20* 基因功能障碍诱发房颤可能主要与触发活动增加有关。

值得注意的是, 既往有报道 *TBX20* 基因突变可导致多种不同类型的心血管疾病, 包括先天性心脏病如法洛四联症、室间隔缺损、房间隔缺损、房室共同通道、主动脉缩窄、动脉导管未闭、右室双流出道、异常肺静脉连接、心脏瓣膜畸形及扩张性心肌病<sup>[1,19]</sup>。本研究提示 *TBX20* 基因功能丧失性突变可诱散发散性孤立性房颤, 从而扩大了 *TBX20* 基因突变的表型谱。

总之, 本研究识别出 1 种新的 *TBX20* 基因功能丧失性突变, 该突变可诱发房颤, 为部分房颤的精准防治提供了新的分子靶标。

## 参 考 文 献

- [1] Li N, Li YJ, Guo XJ, et al. Discovery of *TBX20* as a novel gene underlying atrial fibrillation[J]. *Biology (Basel)*, 2023, 12(9):1186.
- [2] Lee DSM, Damrauer SM, Levin MG. Genetics of atrial fibrillation[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2023, 38(3):162-168.
- [3] January CT, Wann LS, Alpert JS, et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society[J]. *Circulation*, 2014, 130(23):e199-e267.
- [4] Pan Y, Geng R, Zhou N, et al. *TBX20* loss-of-function mutation contributes to double outlet right ventricle[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(4):1058-1066.

(下转第 122 页)

- (本文编辑:胡晓静)

- [5] 陈春英, 刘兴元, 杨奕清. 先天性房间隔缺损致病基因 *KLF13* 新突变的识别与功能分析[J]. 国际心血管病杂志, 2023, 50(2):108-112.
- [6] Wang QS, Wang XF, Chen XD, et al. Genetic polymorphism of *KCNH2* confers predisposition of acquired atrial fibrillation in Chinese[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2009, 20(10):1158-1162.
- [7] Sinner MF, Pfeufer A, Akyol M, et al. The non-synonymous coding IKr-channel variant *KCNH2*-K897T is associated with atrial fibrillation: results from a systematic candidate gene-based analysis of *KCNH2* (*HERG*)[J]. Eur Heart J, 2008, 29(7):907-914.
- [8] Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, et al. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in *KCNH2*[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2005, 16(4):394-396.
- [9] Cheng YW, Wu CT, Chang CJ, et al. A novel *KCNH2* S981fs mutation identified by whole-exome sequencing is associated with type 2 long QT syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16):12742.
- [10] Zhou Y, Hao N, Sander JW, et al. *KCNH2* variants in a family with epilepsy and long QT syndrome: a case report and literature review[J]. Epileptic Disord, 2023, 25(4):492-499.
- [11] Chen Y, Xiao D, Zhang L, et al. The role of *Tbx20* in cardiovascular development and function[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:638542.
- [12] Caballero R, Utrilla RG, Amorós I, et al. *Tbx20* controls the

- (本文编辑:丁媛媛)