

· 临床研究 ·

散发先天性心脏病致病基因 *SOX7* 新突变的发现及功能研究

陆彩霞 刘兴元 杨奕清

【摘要】 目的:寻找散发先天性心脏病(CHD)致病基因 *SOX7* 新突变并研究其功能。**方法:**选取 116 例散发 CHD 患儿和 228 名无 CHD 对照儿童,对其 *SOX7* 基因进行测序分析,以发现新的致 CHD 突变。克隆 *SOX7* 基因并构建野生型人 *SOX7* 表达质粒,通过定点诱变产生突变型人 *SOX7* 表达质粒,使用脂质体转染多种表达质粒入 HeLa 细胞,应用双报告基因定量分析突变的功能效应。**结果:**在 1 例男性散发先天性室间隔缺损患儿中发现了 *SOX7* 基因新突变,即 NM_031439.4:c.361C>T;p.(Gln121*) 突变;在其他 115 例 CHD 患儿和 228 名无 CHD 对照者中未检测出该突变。双报告基因定量研究表明,突变型人 *SOX7* 对其关键靶基因 *GATA4* 的转录激活作用消失。**结论:***SOX7* 基因突变可能是一部分散发 CHD 的病因,这对 CHD 的个体化防治有潜在的临床意义。

【关键词】 先天性心脏病;分子遗传学;*SOX7* 基因;转基因;报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2024.04.012

Identification and functional study of a novel *SOX7* mutation associated with sporadic congenital heart disease LU Caixia¹, LIU Xingyuan², YANG Yiqing³. 1. Department of Pediatrics, Shanghai Yangpu District Kongjiang Hospital, Shanghai 200093; 2. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065; 3. Department of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, and Central Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

【Abstract】 Objective: The aim of this study was to search for a novel *SOX7* mutation and to assess its function in sporadic congenital heart disease (CHD). **Methods:** 116 children suffering from sporadic CHD and 228 non-CHD children were enrolled. Sequencing assay of *SOX7* gene was performed to detect a new CHD-causing mutation. Then, *SOX7* gene was cloned and wild-type eukaryotic expression vector *SOX7*-pcDNA3.1 was generated. The mutant-type *SOX7*-pcDNA3.1 expression vector was created via site-directed mutagenesis. HeLa cells were transfected with expression vectors using lipofectamine, and the functional impact of mutant-type *SOX7* was assessed by utilizing dual-reporter genes. **Results:** A novel *SOX7* mutation, NM_031439.4:c.361C>T;p.(Gln121*), was identified in a boy with a sporadic congenital ventricular septal defect, which was not detected in the remaining 115 children with sporadic CHD as well as in 228 non-CHD children. Dual-reporter gene measurement unveiled that Gln121*-mutant *SOX7* lost the transcriptional activation on its key target gene *GATA4*. **Conclusion:** *SOX7* mutation may cause sporadic CHD in a minority of patients, implying its potential usefulness for the personalized prophylaxis and treatment of congenital CHD.

【Key words】 Congenital heart disease; Molecular genetics; *SOX7* gene; Transgene; Reporter gene analysis

基金项目:上海市自然科学基金(16ZR1432500)

作者单位:200093 上海市杨浦区控江医院儿科(陆彩霞);200065 上海,同济大学医学院附属同济医院儿科(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 (CHD) 在全球活产新生儿中的发病率约为 1%, 如将二叶式主动脉瓣等微小畸形包括在内, 其发病率高达 3%^[1]。CHD 可因血流动力学异常而导致多种并发症, 如肺动脉高压、急性脑损伤、中枢神经发育延迟、慢性肾病、感染性心内膜炎、主动脉夹层破裂、充血性心力衰竭, 甚至心源性死亡^[2]。人类 CHD 主要为遗传异常所致, 目前已经发现超过 100 个 CHD 相关突变基因^[2-4]。Huang 等^[5]报道, *SOX7* 基因突变可诱发家族性 CHD。*SOX7* 基因突变是否也会诱散发散性 CHD 尚不明确。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2013 年 6 月至 2022 年 12 月, 自同济大学医学院附属同济医院儿科就诊的汉族患儿中选取 116 例散发性 CHD 患者为病例组, 其中 51 例为女性, 65 例为男性, 年龄 1~14 岁, 平均年龄 (5±3) 岁。选取 228 名无 CHD 儿童为对照组, 其中女性 101 名, 男性 127 名, 年龄 1~14 岁, 平均年龄 (5±2) 岁。所有研究对象均接受病史回顾分析、普通体格检查及心脏超声检查。CHD 的诊断标准如文献 [2] 所述。本病例对照研究符合医学伦理要求, 获得同济医院医学伦理委员会审批 [LL (H) -09-07]。经研究对象的父母知情同意后, 收集临床数据和血标本, 并常规纯化基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 人 *SOX7* 基因的体外扩增

通过聚合酶链反应 (PCR) 体外扩增人 *SOX7* 基因编码外显子、剪接供体 / 受体的寡核苷酸引物序列见参考文献 [5]: 其中扩增 *SOX7* 基因编码外显子 1 的正向引物为 5'-GATAAATCA GGGGCCGGGTC-3', 反向引物为 5'-GTTTCACTT TGGACCGCGCC-3', 扩增片段长 567 bp; 扩增 *SOX7* 基因编码外显子 2 第 1 部分正向引物为 5'-GGGAAGAGGGTGCAAGAGAT-3', 反向引物为 5'-CTACAGTGGAGAGGGCTTGG-3', 扩增片段长 675 bp; 扩增 *SOX7* 基因编码外显子 2 第 2 部分正向引物为 5'-CCCACACCTCCTGAAATGTC-3', 反向引物为 5'-GTGGGAGGAAAGCTGGTGTG-3', 扩增片段长 660 bp。以研究对象的基因组 DNA 为模板, 通过 DNA 合成仪器 (美国 Life Technologies 公司) 合成并纯化的上述扩增的 *SOX7* 引物和 DNA 聚合酶试剂盒 (美国 Life Technologies 公司) 在

PCR 机 (美国 MJ Research 公司) 上扩增 *SOX7* 基因。PCR 混合物的总体积定为 50 μL, 包括 5×Phusion HF 缓冲液 10 μL、双蒸去离子水 34.5 μL、基因组 DNA (40 ng/μL) 2 μL、Phusion DNA 聚合酶 (2 U/μL) 0.5 μL、dNTPs (10 mmol/L) 1 μL 及正、反向引物 (20 μmol/L) 各 1 μL。PCR 温度时间设置 98 °C 预变性持续 30 s; 35 次循环, 每次循环包括 98 °C 持续 10 s (变性)、62 °C 持续 20 s (退火) 及 72 °C 持续 30 s (延伸); 72 °C 持续 6 min (延长)。PCR 扩增产物经凝胶电泳分离后切胶回收, 用 GeneJET 凝胶 DNA 纯化试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司) 对 PCR 扩增产物进行纯化。

1.2.2 *SOX7* 基因的 PCR- 测序与序列分析

以纯化的 PCR 扩增产物即目的 DNA 片段作模板, 用 1 条 *SOX7* 扩增引物和 DNA 测序试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司) 在 PCR 机 (美国 Stratagene 公司) 上完成测序 PCR。DNA 测序 PCR 混合物的总体积定为 20 μL, 其中包括正向 *SOX7* 基因扩增引物 (2 μmol/L) 1 μL、*SOX7* 基因片段 (30 ng/μL) 2 μL、双蒸去离子水 9 μL 及预混合液 8 μL。DNA 测序 PCR 的条件如前所述^[6]。测序 PCR 扩增产物经纯化后在遗传分析仪 (美国 Thermo Scientific 公司) 上进行测序。通过比较所测的 *SOX7* 序列与核苷酸数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>) 所发布的 *SOX7* 序列 (登陆号: NM_031439.4) 可识别出 *SOX7* 基因突变。一旦识别出 *SOX7* 突变, 则测序分析 228 名无 CHD 儿童的 *SOX7* 基因, 同时检索 ExAC、1000G 和 gnomAD 群体遗传数据库 (<https://www.genecascade.org/MutationTaster2021/#transcript>), 以核实所发现的 *SOX7* 基因突变是否为新突变。

1.2.3 *SOX7* 突变的致病性预测

应用在线计算机软件 MutationTaster2021 (<https://www.genecascade.org/MutationTaster2021/#transcript>) 预测本研究所发现的 *SOX7* 突变是否致病。

1.2.4 *SOX7* 突变的功能特性研究

制备野生型人 *SOX7*-pcDNA3.1 质粒及其关键靶基因 *GATA4* 启动子驱动报告基因即萤火虫荧光素酶 (luc) 基因表达的 *GATA4*-luc 质粒的方法见文献 [5]。使用 1 对等长、互补的核苷酸引物 (正向引物序列: 5'-CCGCGCAGGAAGAAGTAGGCC AAGCGGCTGT-3'; 反向引物序列: 5'-ACAGCCGC

TTGGCCTACTTCTTCCTGCGCGG-3')和定位诱变试剂盒(美国 Invitrogen 公司),以野生型人 *SOX7*-pcDNA3.1 为模板,通过 PCR 产生 Gln121* 突变型人 *SOX7*-pcDNA3.1 质粒。使用 DNA 酶如 Dpn I (美国 New England Biolabs 公司)消化野生型人 *SOX7*-pcDNA3.1 模板,经直接测序证实产生了 Gln121* 突变型人 *SOX7*-pcDNA3.1 质粒。HeLa 细胞的体外常规培养及多种细胞表达质粒即载体的转染方法见文献[5]。在 HeLa 细胞生长于板孔至 80% 富聚时,借助脂质体 Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司)分别转染 400 ng 的 pcDNA3.1 空载体、400 ng 的野生型 *SOX7*-pcDNA3.1 载体、400 ng 的 Gln121* 突变型 *SOX7*-pcDNA3.1 载体、200 ng 的 pcDNA3.1 空载体+200 ng 的野生型 *SOX7*-pcDNA3.1 载体或 200 ng 的野生型 *SOX7*-pcDNA3.1 载体+200 ng 的 Gln121* 突变型 *SOX7*-pcDNA3.1 载体,同时转染 20 ng 的表达海肾荧光素酶的质粒 pGL4.75 (内对照)和 1 μ g 的 *GATA4*-luc 质粒。多种质粒转染 HeLa 细胞后 48 h 收集、裂解细胞。应用美国 Promega 公司的双报告基因分析系统在美国 Promega 公司的荧光定量检测仪上测定 2 种荧光素酶的活性。*SOX7* 的关键靶基因

GATA4 启动子的转录活性用萤火虫与海肾的荧光素酶活性之比表示^[5]。

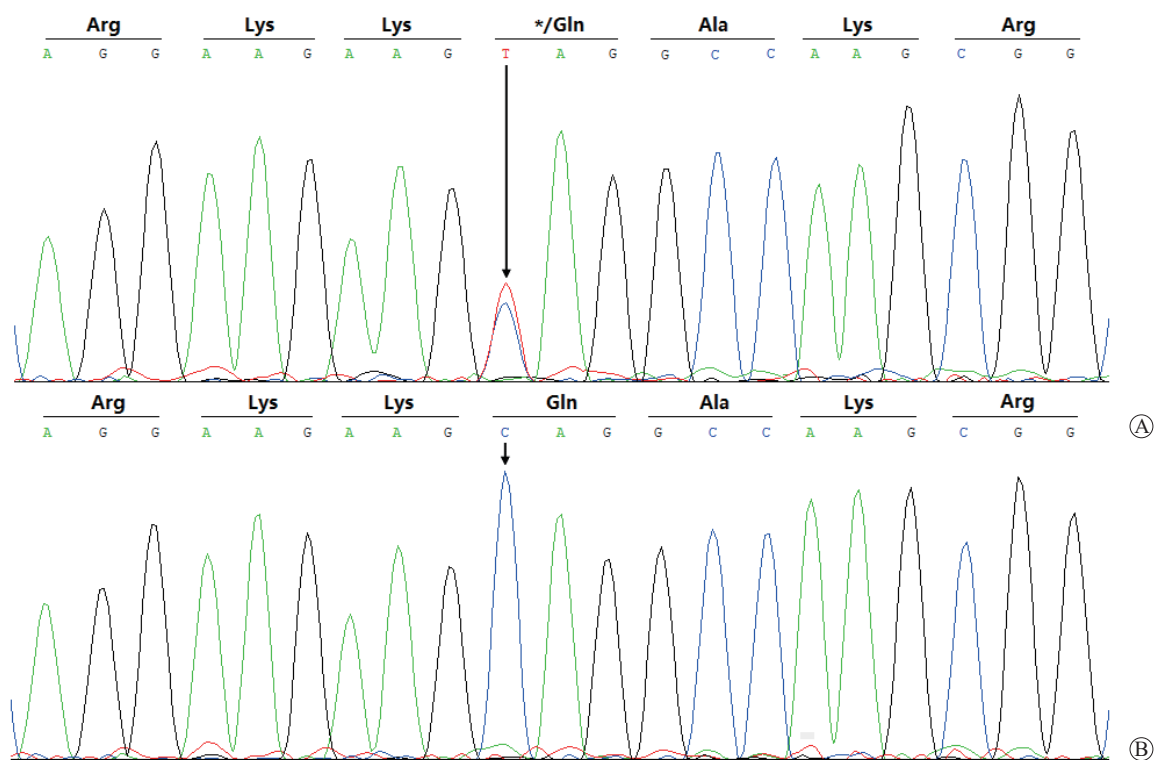
1.3 统计学分析

2 组连续变量数据包括入选研究儿童的年龄、人 *SOX7* 的关键靶基因 *GATA4* 启动子的活性等的比较用非配对 Student's *t* 检验;2 组分类变量数据包括入选研究儿童的种族、性别等的比较用 Fisher 精确概率检验。双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 识别出人 *SOX7* 基因新突变

测序分析 116 例散发性 CHD 患儿 *SOX7* 基因,在 1 例 5 岁男性先天性室间隔缺损患儿检测出 *SOX7* 基因突变,即 NM_031439.4:c.361C>T;p.(Gln121*) 突变,在其他 115 例 CHD 患儿和 228 名无 CHD 对照者中未检测出该突变,在 ExAC、1000G 和 gnomAD 群体遗传数据库中也均无报道(<https://www.genecascade.org/MT2021/MutationTaster102.cgi>),表明该 *SOX7* 基因突变是 1 个新发现的突变。该 *SOX7* 基因 c.361C>T 杂合突变型及其纯合野生型对照序列见图 1。



注:箭头指向突变携带者 *SOX7* 基因的 c.361C>T 杂合突变型 T/C (A) 和对照者 *SOX7* 基因的纯合野生型 C/C (B)

图1 *SOX7* 基因 c.361C>T 杂合突变和纯合野生型 DNA 碱基序列

2.2 人SOX7基因新突变c.361C>T有致病性

人SOX7基因c.361C>T突变被MutationTaster 2021 预测为新的致病性突变。

2.3 Gln121*突变型人SOX7对其关键靶基因GATA4无转录激活作用

在体外常规培养、转染了细胞表达质粒的HeLa细胞中,同等剂量(0.4 μg)的野生型人SOX7-pcDNA3.1表达质粒(SOX7)和Gln121*突变型人SOX7-pcDNA3.1表达质粒(Gln121*)对关键靶基因GATA4启动子的转录激活效应分别约为9倍(9.43 ± 0.80)和1倍(1.19 ± 0.55),2组(纯合SOX7与纯合Gln121*)之间差异有统计学意义($t=14.73, P<0.01$);而在同时转染0.2 μg的SOX7和0.2 μg的Gln121*时,所诱导的转录激活效应约为5倍(4.93 ± 0.51),显著低于0.4 μg的SOX7所诱导的转录激活效应(即约9倍),2组(纯合SOX7与杂合Gln121*)间差异有统计学意义($t=8.19, P<0.01$)。

3 讨论

本研究在1例5岁的先天性室间隔缺损男性患儿发现了1个新的SOX7基因突变即NM_031439.4:c.361C>T;p.(Gln121*)突变。功能研究显示Gln121*突变型人SOX7蛋白丧失了对其关键靶基因GATA4启动子的转录激活功能。这些研究发现支持SOX7基因突变c.361C>T即p.(Gln121*)是该例散发性先天性室间隔缺损患儿的分子病因。

人类SOX7基因定位于8p23.1,编码1种由388个氨基酸组成的SOX家族转录因子,大量表达于包括小鼠和人类在内的哺乳动物的胚胎心脏组织^[5]。既往研究发现,SOX7可以独自或与NKX2.5等协同激活多个心脏关键基因的表达,包括BMP2、GATA4和GATA6^[7-9],而且已经发现GATA6、GATA4、BMP2和NKX2.5基因突变皆可引发CHD^[10-13]。本研究发现了1个新的SOX7基因无义突变,定量生化分析表明Gln121*突变型人SOX7失去了对关键靶基因GATA4的转录激活效应。这些研究支持SOX7基因单倍型不足是人类CHD的分子病理机制之一。

对实验动物模型进行的研究表明,Sox7基因功能障碍会导致CHD。在非洲爪蟾中,敲低Sox7或Sox18可部分抑制心脏发育,而同时敲低Sox7和Sox18则强烈抑制心脏发育^[14]。此外,Sox7 RNA

可以消除Sox18敲低的作用,反之亦然,表明这2个基因在功能上至少可以部分相互代偿、共享冗余功能^[14]。在小鼠中,Sox7基因敲除可导致胚胎发育迟缓、心包囊扩张和卵黄囊重构障碍以及胚胎死亡,表明心血管发育受到严重抑制^[15]。类似地,内皮特异性敲除Sox7基因可导致小鼠心脏功能衰竭和血管生成严重受损及胚胎死亡;而小鼠条件性心内膜Sox7基因敲除可导致房室垫形成异常、部分房室间隔缺损以及心房间隔和心室间隔的闭合缺陷^[8]。此外,SOX7蛋白可通过WNT4-BMP2信号通路调节内皮细胞向间充质细胞的转变过程,这对房室垫的正常发育至关重要^[8]。人类含有SOX7基因的8p23.1微缺失和SOX7基因重复均与先天性心脏间隔缺损有关^[8,16-17]。此外,已经发现SOX7突变可诱发家族性CHD,包括先天性肺动脉狭窄、室间隔缺损以及动脉导管未闭^[5]。

本研究识别了1个新的可诱发CHD的SOX7功能丧失性突变,从而揭示了CHD新的分子病理,有助于改善CHD患者的个体化防治策略。

参 考 文 献

- [1] Tsao CW, Aday AW, Almarazooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2023, 147(8):e93-e621.
- [2] Li YJ, Wang J, Ye WG, et al. Discovery of GJC1 (Cx45) as a new gene underlying congenital heart disease and arrhythmias[J]. Biology (Basel), 2023, 12(3):346.
- [3] Diab NS, Barish S, Dong WL, et al. Molecular genetics and complex inheritance of congenital heart disease[J]. Genes (Basel), 2021, 12(7):1020.
- [4] Yasuhara J, Garg V. Genetics of congenital heart disease: a narrative review of recent advances and clinical implications[J]. Transl Pediatr, 2021, 10(9):2366-2386.
- [5] Huang RT, Guo YH, Yang CX, et al. SOX7 loss-of-function variation as a cause of familial congenital heart disease[J]. Am J Transl Res, 2022, 14(3):1672-1684.
- [6] 严梓, 陈春英, 杨奕清, 等. 先天性动脉导管未闭致病基因MESP2新突变的发现与功能分析[J]. 国际心血管病杂志, 2023, 50(3):170-174.
- [7] Zhao L, Jiang WF, Yang CX, et al. SOX17 loss-of-function variation underlying familial congenital heart disease[J]. Eur J Med Genet, 2021, 64(5):104211.
- [8] Hong NC, Zhang EG, Xie HL, et al. The transcription factor Sox7 modulates endocardial cushion formation contributed to atrioventricular septal defect through Wnt4/Bmp2 signaling[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4):393.
- [9] Futaki S, Hayashi YST, Emoto T, et al. Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(23):10492-10503.
- [10] Tan TY, Gonzaga-Jauregui C, Bhoj EJ, et al. Monoallelic

- BMP2 variants predicted to result in haploinsufficiency cause craniofacial, skeletal, and cardiac features overlapping those of 20p12 deletions[J]. Am J Hum Genet, 2017, 101(6):985-994.
- [11] Garg V, Kathiriyai IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5[J]. Nature, 2003, 424(6947):443-447.
- [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] Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, et al. GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(33):13933-13938.
- [14] Zhang C, Basta T, Klymkowsky MW. SOX7 and SOX18 are essential for cardiogenesis in Xenopus[J]. Dev Dyn, 2005, 234(4):878-891.
- [15] Wat MJ, Beck TF, Hernández-García A, et al. Mouse model reveals the role of *SOX7* in the development of congenital diaphragmatic hernia associated with recurrent deletions of 8p23.1[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(18):4115-4125.
- [16] Wat MJ, Shchelochkov OA, Holder AM, et al. Chromosome 8p23.1 deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia[J]. Am J Med Genet A, 2009, 149A(8):1661-1677.
- [17] Long F, Wang XK, Fang SH, et al. A potential relationship among beta-defensins haplotype, *SOX7* duplication and cardiac defects[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e72515.
- (收稿:2023-11-23 修回:2024-01-29)
(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

