

CITED2 基因 SGJ 序列插入突变与先天性心脏病发病

彭婷 李笑天^Δ 王丽

(复旦大学附属妇产科医院-妇产科医院研究所 上海 200011)

【摘要】 目的 分析先天性心脏病 (congenital heart defects, CHD) 患者的 *CITED2* 基因编码链基因突变的情况。方法 收集 101 例散发型 CHD 患者和 104 例正常健康新生儿血液进行 DNA 抽提、PCR 扩增,应用变性高效液相色谱仪进行 *CITED2* 基因全部编码序列的突变检测,对有异常峰型的 DNA 进行直接测序,并与 GeneBank 进行比较。结果 首次在动脉导管未闭的患者发现 *CITED2* 基因的一种新的插入突变,在 *CITED2* 基因编码链碱基 483 位起始处插入一个重复 9 肽(c483_484ins27),导致蛋白的丝氨酸-甘氨酸富含区(SGJ)插入 9 个氨基酸 p. Ser161-Gly162ins9。对照组中未检测到此突变。在 *CITED2* 基因的 EP300 结合基序未发现突变。结论 中国先心病患者中存在 *CITED2* 基因突变,新发现的 *CITED2* 基因的重复 9 肽插入突变 c483_484ins27 可能是导致动脉导管未闭发生的原因之一。

【关键词】 先天性心脏病; *CITED2* 基因; 突变

【中图分类号】 R 725.4 **【文献标识码】** A

Insertion mutation in the serine-glycine rich junction of *CITED2* as potential molecular cause for congenital heart disease

PENG Ting, LI Xiao-tian^Δ, WANG Li

(Department of Obstetrics, Obstetrics and Gynecology Hospital,
Fudan University, Shanghai 200011, China)

【Abstract】 Objective To detect coding regions mutation of *CITED2* gene in patients with congenital heart disease (CHD). **Methods** The blood cell genomic DNA of 101 patients with CHD and 104 normal neonatal was isolated. Whole coding regions were amplified by PCR. The PCR products were detected by DHPLC and samples with different melting profile shapes were sequenced and compared to GeneBank sequence databases. **Results** A novel insertion mutation was first identified in patients with patent ductus arteriosus (PDA) compared with 104 healthy controls. Mutation was located between 483C and 484G (c. 483_484ins27), which resulted in a 9-mer peptides repeat insertion in the serine-glycine rich junction (SGJ) of *CITED2* amino acid sequence. Other patients and healthy individuals were normal. **Conclusions** There was a mutation in *CITED2* gene of Chinese CHD. The 9-mer peptides insertional mutation newly found may be one of the causes for PDA.

【Key words】 congenital heart disease; *CITED2* gene; mutation

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD)是最常见的一种生后缺陷,发病率约 0.6%~1.4%,心脏发育过程中单个或多个基因的突变及功能异常均可能导致心脏畸形的发生。新近研究发现

的 *CITED2* (CBP/p300 interacting transactivators with ED-rich termini 2) 是一种与低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 竞争结合 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP-responsive

element-binding protein, CBP /p300) 的转录调节因子。HIF-1 α 的正常表达是胚胎正常发育所必须的。研究表明基因敲除 *CITED2*^{-/-}小鼠胚胎表现出包括房间隔、室间隔缺损和右室双出口等多种心脏缺陷^[1-3]。说明 *CITED2* 基因是胚胎心脏发育期间一个必不可少的调节基因。但目前国际上有关人类先天性心脏病与 *CITED2* 基因缺陷之间关系的研究还非常有限^[4,5]。国内尚未有该方面研究。因此本研究拟通过检测先心病患者 *CITED2* 基因编码序列,了解中国先心病患者 *CITED2* 基因突变情况。

对象和方法

对象 101例复旦大学附属儿科医院心血管中心的住院先心病患儿作为先天性心脏病病例组。年龄1~14岁。均经超声心动图、心导管检查或外科手术确诊。101例心脏畸形分型见表1,以房间隔缺损、室间隔缺损为主。所有研究对象均为汉族,无血缘关系。经产前B超筛查及产后检查证实没有心脏畸形的新生儿104例作为对照组。

表1 先天性心脏病患者心脏畸形分类

Tab 1 Types of congenital heart defect of patients

Congenital heart defects	n(%)(n=101)
MIH	1(0.99)
TGA	2(1.98)
Complete DORV	2(1.98)
Ostium secundum ASD	14(13.9)
SA,SV	1(0.99)
PAPVC	2(1.98)
VSD	69(81.2)
CoA	2(1.98)
Complex AVSD	1(0.99)
Complete AVSD	2(1.98)
TOF	11(10.9)
PDA	14(13.9)
PS	9(8.93)
Double-chambered right ventricle	2(1.98)
AS	1(0.99)

MIH: Mirror image heart; TGA: Transposition of great arteries; DORV: Double-outlet of right ventricle; ASD: Atrial septal defect; SA: Single atrium; SV: Single ventricle; PAPVC: Partial anomalous pulmonary venous connection; VSD: Ventricular septal defect; CoA: Coarctation of the aorta; AVSD: Atrioventricular septal defect; TOF: Tetralogy of fallot; PDA: Patent ductus arteriosus; PS: Pulmonary stenosis; AS: Aortic valve stenosis

方法

血标本的采集和基因组DNA的提取 病例组研究对象均抽取外周血2 mL,对照组抽取脐血0.2 mL,EDTA抗凝。采用U-geneDNA抽提试剂盒

(安徽优品公司)提取基因组DNA。

聚合酶链反应(PCR) 引物及反应条件均参考文献[5],覆盖 *CITED2* 基因全部编码序列和部分非转录区域(pubmed accession no. NM 006079.3),引用文献中 exon2 正反向引物 1-4 将编码链分为 4 个片段 S1,S2,S3,S4。引物由上海生物工程有限公司合成。反应体系为 25 μ L:10 μ mol/L 正向及反向引物 0.5 μ L;10 \times buffer 2.5 μ L;10 mmol/L dNTP 0.5 μ L;100% DMSO(二甲基亚砜)1.25 μ L;Taq 酶(5 U/ μ L)0.25(晶美 MBI);基因组 DNA 模板(50 ng/ μ L)2 μ L;ddH₂O 17 μ L。循环参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;58 $^{\circ}$ C~61 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。PCR 反应在 ABI PRISM 3700 型 PCR 扩增仪上进行。扩增完毕,取反应产物 5 μ L 与 1 μ L 溴酚蓝加样缓冲液充分混合后,加样于 2% 琼脂糖凝胶点样孔中电泳,电压 120 V,电泳 15 min,停止电泳后,紫外灯观察结果并照相保存。使扩增效率良好并具重复性。

DHPLC 分析 将 *CITED2* 基因根据 GeneBank 中公布的标准序列引入 Wave navigator 软件(美国 Tansgenomic 公司)查找色谱温度。DHPLC 色谱温度条件参考文献[5]。将 PCR 产物经过 95 $^{\circ}$ C 10 min 变性后放在 WAVE 系统 96 孔反应板上,进样、检测和分析。选择设定每份样品吸取 5 μ L,分析柱保留时间 8 min。仪器用缓冲液包括 A 液:0.1 mol/L 的三乙基胺乙酸盐(Triethyl ammonium acetate,TEAA);B 液:0.1 mol/L 的 TEAA 和 25% 的乙腈。

DNA 序列分析 DHPLC 检测发现的异常峰型标本进行 DNA 序列测定以明确序列变异的位点和类型;所用测序仪器为 ABI PRISM 3730,测序试剂为 BigDye terminator v3.1,对插入或缺失序列进行克隆测序。

结果

PCR 扩增结果 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, *CITED2* 基因的编码序列均成功扩增。

DHPLC 检测结果 经 DHPLC 检测后,在 S1 和 S2 及 S3 短片段均发现异常峰型。S1 短片段病例组 7 位、对照组 5 位有异常峰型。峰型一致。提示存在多态,纯合子和杂合子峰型见图 1。S2 和 S3 短片段均在同一位先心病患者有异常三峰,对照组中未发现异常峰型,考虑插入或缺失部位在 S2 及 S3 片段的重叠扩增序列。DHPLC 正常峰型及异常峰型见图 2,进一步测序分析。

测序结果 对 S1 异常峰型测序后发现 S1 短片

段对应的序列变异为编码链第21位碱基由A替换为C(c. -21 A-C);导致7号密码子GCA转变为GCC;由于这两种密码子均编码Ala,所以事实上系同义突变

(Ala7Ala)。查找单核苷酸多态性库 dbSNP (NCBI) 为已报道突变 rs1131400(杂合子测序图见图3)。

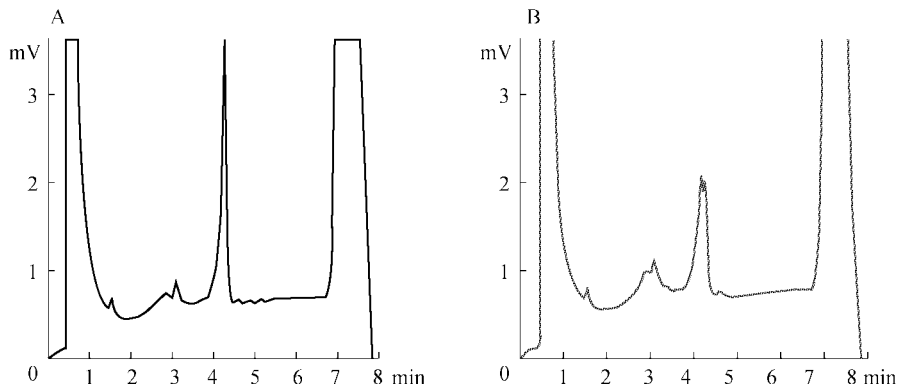


图1 *CITED2* 基因 S1 片段 DHPLC 样本峰

Fig 1 DHPLC run of *CITED2* S1 amplicons

A; Sample is wild-type; B; Sample has a different melting profile; It represents the c. -21 A-C silent mutation

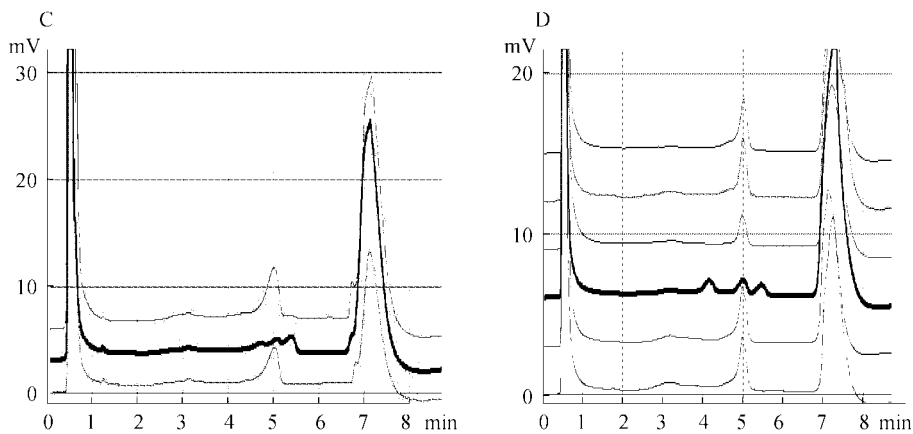


图2 *CITED2* 基因 S2 和 S3 片段 DHPLC 样本峰

Fig 2 DHPLC run of *CITED2* S2 and S3 amplicons

C; Sample was S2 wild and mutation-melting profile; D; Sample was S3 wild and mutation type melting profile.

Three-peak profile can be seen in both figures, they represents the c. 483_484ins27 insertion mutation(insert GGCGGCAG CAGCACCCCC GGCGGCTCG).

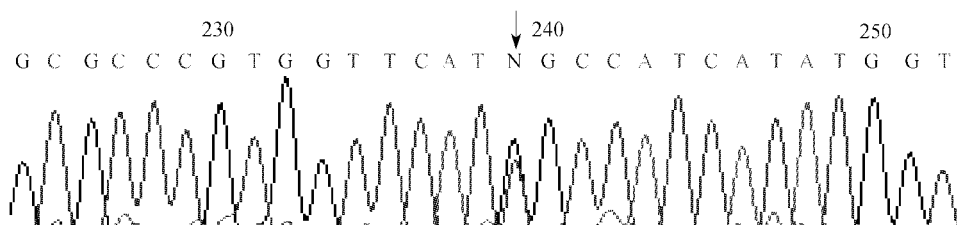


图3 *CITED2* 基因 S1 片段异常峰型对应测序图

Fig 3 DNA sequence analysis of *CITED2* S1 fragment

The heterozygous T-to-G transition at nucleotide 21 (because of antisense strand)

对 S2 和 S3 片段重复 PCR 扩增后产物纯化直接测序。S2 片段正向序列后方与 S3 反向序列后方测序均为重叠套峰,比较后发现在相同位置插入。将 S2 片段进行等位基因克隆测序,结果见图4,患者基因组中存在两种等位基因。引用文献中 exon2 正反

向引物 1-4 将编码链分为 4 个片段 S1, S2, S3, S4。比对 GeneBank 序列,证实在 483 位起始处插入一个重复 9 肽,简称 c. 483_484ins27,插入 27 碱基是与后方 27 个碱基相同的重复序列。插入序列如下: GGCGGCAG CAGCACCCCC GGCGGCTCG。编码

蛋白插入 9 个氨基酸 GGSSTPGGS(G = 甘氨酸, S = 丝氨酸, T = 苏氨酸, P = 脯氨酸)。即 p. Ser161-

Gly162ins9。EP300 结合位点区域未发现突变位点。对照组测序结果均与 GeneBank 中的完全一致。

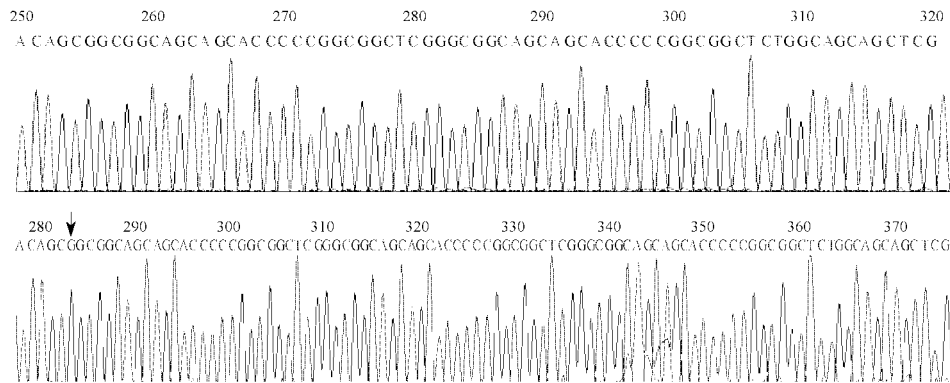


图 4 *CITED2* 基因插入突变对应克隆测序图

Fig 4 DNA clone sequence analysis of *CITED2* insertion mutation fragment

E: The wild-type sense strand of normal sequence; F: The insertion sense strand of allele sequence; Short arrow upon diagram noted the start bit of insertion. Sequence analysis indicated a 9-mer peptides repeat insertion, GGCGGCAG CAGCACCCCC GGCGGCTCG, located between 483 C and 484 G.

讨 论

本研究通过对 101 例先天性心脏病患者 *CITED2* 基因编码序列的检测,首次在一例动脉导管未闭患儿中发现了 *CITED2* 基因新的突变位点,突变位点导致蛋白的丝氨酸-甘氨酸富含区(SGJ)插入重复 9 肽 p. Ser161-Gly162ins9。在 *CITED2* 基因的 EP300 结合基序未发现突变。

突变患者的疾病表型为动脉导管未闭(1/101)。Sperling 等^[4]发现的目前仅知的 3 例先天性心脏病的 *CITED2* 基因致病插入或缺失突变(3/392),疾病表型为房间隔或室间隔缺损以及肺动脉转位,进一步证实了 *CITED2* 基因突变对应先心病表型的多样性,与 *CITED2*^{-/-} 敲除小鼠表现出多样的先心病表型相吻合。

CITED2 基因是胚胎心脏发育一个必不可少的调节蛋白。功能丧失将导致心脏和神经管发育的缺陷^[1-3]。*CITED2*^{-/-} 胚胎的形态学研究和多普勒超声心动图分析均显示严重的心血管异常,包括房间隔缺损和室间隔缺损及右室双出口等。动物模型的发现使人们开始探索人类先心病与 *CITED2* 的关系。

CITED2 基因含有两个外显子,一个内含子,编码 270 个氨基酸,编码链位于外显子 2。*CITED2* 基因序列的显著特征是有有一个罕见的(3 kb) CpG 岛覆盖启动子部分和全部的编码链。有一个特征性的位于羧基端的编码 32 个氨基酸的 EP300 结合基序特征性结合 cAMP 应答元件结合蛋白 p300/

CBP^[6]。EP300 结合基序编码蛋白 Asp224-Phe255。此外还有一个特殊的由(CGG)_n简单序列重复组成的 DNA 序列片段编码丝氨酸-甘氨酸富含区 (serine-glycine rich junction SGJ),SGJ 对应的蛋白结构位于 Ser161-Gly199^[7]。

EP300-结合基序是 *CITED2* 基因发挥作用的关键部位。*CITED2* 主要通过 HIF-1 竞争性结合 CBP /p300 阻断 HIF-1 和 CBP /p300 的 CH1 (cysteine-histidine-rich 1 半胱氨酸-组氨酸富含区)位点间的相互作用实现对缺氧信号的抑制^[8,9]。HIF-1 对胚胎正常发育非常关键,转录活性需要精确的缺氧信号触发和 *CITED2* 的反馈抑制^[10]。受 HIF-1 调节的一些基因,如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 会在 *CITED2*^{-/-} 胚胎心脏中有显著增加,而 VEGF 转基因胚胎也表现出与 *CITED2*^{-/-} 小鼠胚胎相似的心脏病^[9]。因此推断此区域的突变可能导致先心病的发生,但迄今为止,在 EP300-结合区域未发现一例基因突变^[4,5]。本研究在 101 例病人中也未发现此区域的序列改变。

蛋白序列分析 *CITED2* 基因 SGJ 区域具有很强的可弯曲性,潜在的功能可能是作为“铰链”连接羧基端的 EP300-结合基序与氨基端^[7]。CBP /p300、*CITED2* 和 *TFAP2C*(transcription factor-Ap2C)是神经管和心脏正常所必需的^[11]。p. Ser170-Gly178del 造成 *CITED2* 基因与 *TFAP2C* 基因共激活作用显著下降。*CITED2*^{-/-} 胚胎心脏缺陷部分原因是 *CITED2* 缺少时 *TFAP2C* 功能改变引起的^[2]。SGJ 区域的突变导致对 HIF1- α 的转录抑制调节能力显著

下降。Sperling 认为此区域的插入或缺失突变可能导致蛋白构象改变,影响 EP300 结合结构域与 EP300 或其他辅因子的相互作用^[4]。

Sperling 发现的目前仅知的 3 种先天性心脏病的 *CITED2* 基因致病插入或缺失突变 p. Ser170-Gly178del, p. Gly178-Ser179ins9, p. Ser198-Gly199del 全部集中在 Ser161-Gly199 这个区域,提示这部分 DNA 重复序列可能是先心病的致病突变热点区域。本研究发现的新的突变位点 p. Ser161-Gly162ins9 虽然与以往发现的 3 种突变不同,但也集中在丝氨酸-甘氨酸富含区 SGJ 对应的 DNA 序列。为 SGJ 是先心病的致病突变热点区域的观点进一步提供了临床依据,说明 *CITED2* 基因 SCJ 区域的突变可能导致先天性心脏病的发生。推测本实验发现的新的基因突变 p. Ser161-Gly162ins9 也可能通过改变蛋白质构象从而影响 EP300 结合结构域与 EP300 或其他辅因子的相互作用。

本研究还检测到多态性位点系同义突变 (Ala7Ala)。基因型构成分析显示符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。表明本研究对照的位点多态性已达到遗传平衡,有群体代表性。通过比较先心病病例组与对照组基因型和等位基因频率,无显著性差异,按 CHD 类型分型再比较,病例组与对照组相比差异也没有显著性。

总之,本研究为 *CITED2* 基因可能是人类先天性心脏病致病基因之一提供了新的证据。不足之处是样本量较少,需进一步扩大样本,且未对基因突变可能导致的蛋白功能改变进行分析,需要进一步通过构建突变质粒转染后研究对所调节蛋白功能的影响。

致谢 实验过程中,得到德国马普学会分子基因研究所 Sperling 教授提供 DHPLC 色谱温度条件及复旦大学附属儿科医院心血管中心全体工作人员在标本收集过程中提供的各种便利和帮助,特致谢意。

参 考 文 献

[1] Weninger WJ, Lopes Floro K, Bennett MB, et al. *CITED2* is

required both for heart morphogenesis and establishment of the left-right axis in mouse development[J]. *Dev*, 2005, 132(6): 1 337 - 1 348.

- [2] Bamforth SD, Braganca J, Eloranta JJ, et al. Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking *CITED2*, a new Tfp2 co-activator[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(4): 469 - 474.
- [3] Bamforth SD, Braganca J, Farthing CR, et al. *CITED2* controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(11): 1 189 - 1 196.
- [4] Sperling S, Grimm CH, Dunkel I, et al. Identification and functional analysis of *CITED2* mutations in patients with congenital heart defects[J]. *Hum Mutat*, 2005, 26(6): 575 - 582.
- [5] Volcik KA, Zhu H, Finnell RH, et al. Evaluation of the *CITED2* gene and risk for spina bifida and congenital heart defects[J]. *Am J Med Genet A*, 2004, 126(3): 324 - 325.
- [6] Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, et al. Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1 [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(1): 64 - 75.
- [7] Leung MK, Jones T, Michels CL, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human *CITED2* gene encoding p35srj/Mrg1[J]. *Genomics*, 1999, 61(3): 307 - 313.
- [8] Sun HB, Zhu YX, Yin T, et al. MRG1, the product of a melanocyte-specific gene related gene, is a cytokine-inducible transcription factor with transformation activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(23): 13 555 - 13 560.
- [9] Yin Z, Haynie J, Yang X, et al. The essential role of *CITED2*, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(16): 10 488 - 10 493.
- [10] Xu B, Doughman Y, Turakhia M, et al. Partial rescue of defects in *CITED2*-deficient embryos by HIF-1alpha heterozygosity[J]. *Dev Biol*, 2007, 301(1): 130 - 140.
- [11] Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, et al. Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and *CITED2*[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 16 021 - 16 029.

(收稿日期: 2008-02-21; 编辑: 沈玲)