

LMNA 基因突变与先天性心脏病患者的关系研究

林 炜 王涵磊 林志勇 葛捍伟 薛继阳 楼志凌 赵琦峰

摘 要 目的 研究核纤层蛋白(LMNA)基因在先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)患者中的突变情况。方法 本研究分别对 100 例 CHD 患儿及 100 例正常体检儿童进行 LMNA 基因组提取,用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)分别扩增 LMNA 基因功能区 12 个外显子部分,并使用 DNA 测序技术测序,用 GenBank 中的 LMNA 序列作为模板序列进行比对。结果 所有 CHD 患儿及正常体检儿童中 LMNA 基因均未发现突变。结论 LMNA 基因突变与 CHD 患者之间可能无明显相关性。

关键词 先天性心脏病 LMNA 基因 基因测序

中图分类号 R654.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.11.016

Association between LMNA Gene Mutation and People with Congenital Heart Disease. Lin Wei, Wang Hanlei, Lin Zhiyong, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the relationship between LMNA gene mutation and people with congenital heart disease (CHD). **Methods** DNA was isolated from 100 patients with CHD and 100 healthy children as controls. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing were used to detect all 12 exons sequences of LMNA gene and then the DNA sequences were further compared with the LMNA sequence in Pubmed's genebank. **Results** The mutation of LMNA gene was not found in all CHD patients and control subjects. **Conclusion** The mutation of the LMNA gene is may not related to CHD in the people.

Key words Congenital heart disease; LMNA gene; Gene Sequencing

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)简称先心病,是一种由多因素导致的疾病,其致病机制十分复杂,致病因素主要是环境因素和基因因素^[1]。先天性心脏病是先天性遗传病最常见的类型,发生率约为 0.6%~1.2%^[2]。大约 5%~8% 的 CHD 是由于染色体的异常引起的,其中 3% 的基因缺陷在一级家庭成员中具有高复发风险^[3]。我国的先心病发生率呈逐年上升趋势,每年大约有 15 万~20 万的先心病患儿出生^[4]。研究 CHD 的分子机制,不仅对 CHD 发生的机制和遗传干预有重要的理论依据作用,而且为探索行之有效的疾病筛查和诊治技术预防 CHD 的发生提供新的思路。

LMNA 基因是编码核纤层蛋白,核纤层蛋白的异常会导致多种疾病的发生,根据临床特征不同,至今被认识的核纤层蛋白病已有 10 余种,包括 Emery -

Dreifuss 肌营养不良、Hutchinson - Gilford 早衰综合征(Hutchinson - Gilford progeria syndrome, HGPS)、扩张性心肌病等^[5]。LMNA 基因突变会引起多种心脏异常,如心肌病、心脏传导异常等,但与先天性心脏发育异常的关系研究未见报道。本研究团队早期发现 1 例先天性心脏发育异常[室间隔缺损(VSD) + 房间隔缺损(ASD)]伴 HGPS 的患者(图 1),早衰综合征是罕见的儿童过早衰老性疾病,研究发现绝大多数 HGPS 病例的遗传基础是在 LMNA 基因的第 11 个外显子中 G608G 发生了突变^[6]。笔者对该患者进行高通量外显子测序和群体比对,发现其致病基因也是 LMNA 基因,并发现了 LMNA 基因的新突变 c.407A>G,蛋白质水平突变为 p.D136G(图 2);笔者对具体突变进行分析,发现突变位点高度保守,同时利用多种软件预测都提示该突变为致病突变(图 3)。已有报道研究人员利用 CRISPR 基因编辑技术成功对 HGPS 突变 DNA 进行定点编辑及修正^[7]。本研究通过分析 LMNA 基因与先天性心脏病的关系,为未来提早干预并治疗先心病提供可能。

编码核纤层蛋白的 LMNA 突变可引起一系列表型不同的疾病,本研究拟利用新一代基因测序技术探

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY17H020012);浙江省温州市科技局公益性社会发展科技项目(Y20150081);浙江省卫生厅重点支撑学科——小儿外科学(11-ZC27)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院心胸外科、儿童心脏中心、温州医科大学心脏发育与转化研究所

通讯作者:赵琦峰,电子邮箱:zhaof1862@163.com

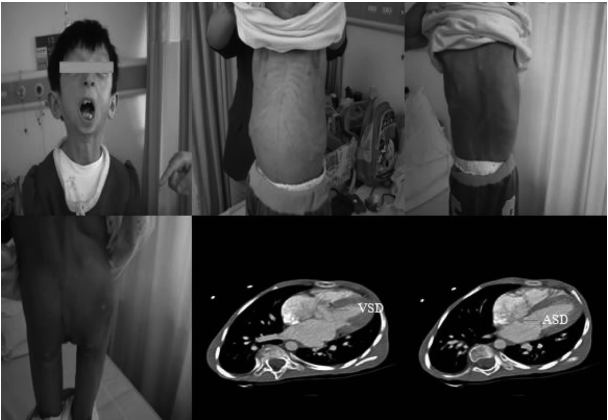


图 1 CHD (VSD + ASD) 伴 HGPS 的患儿

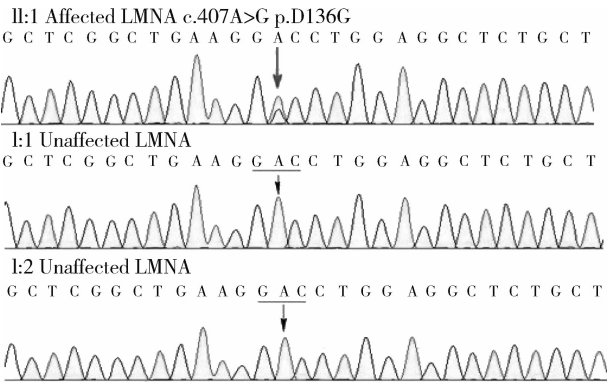


图 2 新发现的 LMNA 基因突变

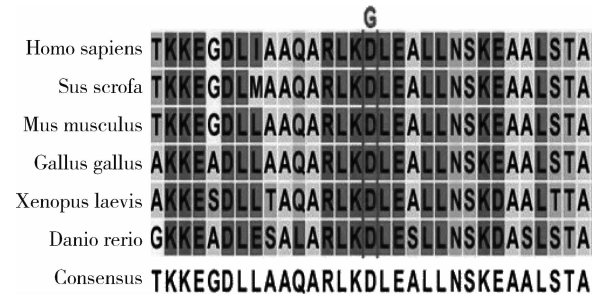


图 3 LMNA 基因新突变保守性分析及预测

讨 LMNA 基因突变与人类先天性心脏发育异常的关系,从基因层面探索 CHD 患者的遗传学背景,分析 LMNA 突变在先天性心脏发育异常中的比例与分布情况。

资料与方法

1. 一般资料:选取 2016 ~ 2017 年温州医科大学附属第二医院小儿心胸外科所收治的 100 例 CHD 患者并随机选取 100 例种族匹配的例行身体检查的健康儿童作为对照组。CHD 组男性 62 例,女性 38 例,

患儿年龄 0.5 ~ 14 岁,平均年龄 2.1 ± 2.7 岁。对照组男性 60 例,女性 40 例,年龄 1 ~ 12 岁,平均年龄 2.4 ± 2.1 岁。所有 CHD 患者均经超声心动图、心电图、胸部 X 线片及心脏手术确诊,排除综合性先天性心脏病患儿(如 Down 综合征、DiGeorge 综合征)。本研究经温州医科大学伦理学委员会批准,且患儿或家属均知情同意并签字。

2. 标本采集:患儿均采集空腹外周静脉血 4 ~ 5ml 至 EDTA 抗凝采血管中,混匀,将标本存放于 -80℃ 冰箱中,待测。

3. 制备基因组 DNA:用常规饱和酚 - 氯仿法提取基因组 DNA:①将 300 ~ 400μl 血液加入至 1ml 细胞裂解液中,充分颠倒混匀后,8000r/min 离心 10min 至细胞沉淀较完全;②弃去上清,取 1ml 细胞裂解液加入,用枪头轻轻敲打使细胞沉淀散开,继续 8000r/min 离心 5min;③重复步骤②直至液体澄清;④弃去上清,分别将 STE 300μl、20% SDS 20μl、蛋白酶 K (10μg/μl) 15μl 加入离心管中,充分混匀后置于 50℃ 水浴锅中 12h;⑤12h 后从水浴锅中取出离心管,取 100μl 饱和 NaCl 溶液 (6mol/L) 加入,轻轻晃动可见白色沉淀析出,继续冰浴 10min 至沉淀完全析出,4℃ 环境下 5000r/min 离心 10min;⑥取出上清液至新的离心管中,在通风橱中取等体积酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 加入,5000r/min 离心 10min,取上清后加入 3 倍体积冷乙醇,轻轻颠倒摇晃,有白色絮状 DNA 沉淀析出;⑦4℃ 环境下 5000r/min 离心 10min,弃去冷乙醇,可见离心管底有块状 DNA 沉淀,将离心管倒置于滤纸上使水分自然晾干;⑧加入 200μl TE Buffer,并利用紫外分光光度计测定所得 DNA 浓度,4℃ 冰箱中保存。

4. 引物设计 LMNA:LMNA 基因序列来自 GenBank (NC_000001.11)。利用 Primer 5.0 软件设计 1 ~ 12 号外显子的 PCR 引物用于扩增目的片段及测序,引物序列见表 1。

5. LMNA 基因 1 ~ 12 号外显子 PCR 反应体系:从离心管中根据所测浓度取出模板 DNA 约 20ng,加入正向与反向引物 (10pmol/L) 各 1μl,2 × PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 10μl,补双蒸水至 20μl。其中,PCR 的发生条件如下:预变性环节,温度 95℃,时间 5min;变性环节,温度 95℃,时间 30s;退火环节,温度范围 55℃,时间 60s;延伸环节,温度 72℃,时间 30s;终延伸环节,温度 72℃,时间 5min。共 35 个循环。

表 1 LMNA 基因 1~12 号外显子引物序列

外显子	正向引物(5'→3')	反向引物(3'→5')	长度(bp)
1	ACTCCGAGCAGTCTCTGT	TTCCCTCTCTGTCTCTCTT	640
2	ATGCCCTCTCCTGGTAATTG	GATGTGACCTCAGTGGGTAAA	440
3	TCTCTTAGCACAGTACCTACCA	TACTCCATGAGCCACTACCA	503
4,5	TGGTAGTGGCTCATGGAGTA	ATCCTGCGACCCTTCTC	773
6,7	TTGCAGATCCTGGAGAGAGTAG	GAACCAGAGTGTGGAGGAGATA	791
8,9	GTGTGTGTAGATGGAAGGAGAG	CCCTGAATTGGCAAACCTGG	532
10	CTTAGCTCCATCACCACAGAG	CAAGGTATAGGGAGGAGAGAGA	404
11	TTATGTCTTCCCTCTCTCTCTC	GTGGGCTGTCTAGGACTCA	614
12	CCTAGACAGCCACCTCT	GGGAGGAGAAATTAGGATTGAGATAG	455

6. 基因测序: 将 PCR 产物回收送杭州擎科梓熙生物技术有限公司, 以 PCR 上游引物为测序引物, 用 ABI 3730xl 自动测序仪进行测序, 使用序列分析软件 SnapGene 分析测序结果并将所测序列与 GenBank 中的已知序列进行比来识别基因变异。

结 果

1. PCR 结果: 琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物并与标准 DNA Marker 比对, 各 PCR 产物与设计的各片段大小基本符合。

2. DNA 测序结果: 在 CHD 患者组中的 LMNA 基因中均未发现突变。

讨 论

LMNA 基因位于 1q21.2~q21.3, 基因组序列长度 56.7kb, 其中编码区域长度约为 24kb, 共编码 12 个外显子。LMNA 基因转录时, 10 号外显子会发生选择性剪切, 此时会有两种不同的 mRNAs, 分别编译两种不同的蛋白, 即 prelamin A 和 lamin C^[8]。prelamin A 的 C 末端是“CAAX”模序, 经金属蛋白酶 Zmpste24、肽链内切酶 2、异戊烯半胱氨酸羧基端甲基转移酶作用后转化为 lamin A^[9]。lamin C 和 lamin A 的 N 末端有相同的 566 个氨基酸残基, 由 LMNA 基因编码的这两种主要产物 lamin A/C 属于核膜中间丝蛋白, 其作用在于维持细胞核膜内层结构和功能, 是核膜中主要的骨架蛋白, 它在染色质结构和基因组的空定位中发挥作用并能决定细胞核的大小和形状^[10,11]。越来越多的证据表明, 在 DNA 复制、RNA 转录、细胞分化和凋亡中 lamin A/C 也参与并发挥着重要的作用^[12]。有许多研究已经明确了 LMNA 基因的 400 多种突变, 可表达 20 多种不同的表现型, 与心肌病相关位点就多达 100 多个, 导致各种不同类型的心肌病^[13]。LMNA 基因突变导致的扩张性心肌病特征为心腔大、室壁薄、常伴有心脏传导系统疾病、发病早、预后差^[14]。笔者前期发现的 1 例 LMNA 基因突

变国际上尚无报道, 此病例患儿表现为早老症, 涉及心血管、骨骼、肌肉及皮肤脂肪等多种系统和组织异常, 并无心肌病的表现, 但存在 CHD(VSD+ASD), 关于 LMNA 基因与 CHD 的相关性目前国内外尚无研究报道。

本研究分别通过对 100 例 CHD 患儿及 100 例正常体检儿童进行 LMNA 基因的突变筛查, 结果未发现任何突变, LMNA 基因突变与 CHD 患者之间可能无明显相关性。基因在地区、人群、遗传背景中的分布具有不同的特异性, 因此要从多地区、多人群、大样本的研究中才能明确某一基因在致病过程中发挥的作用, 从根本上解释发病机制。因此, LMNA 基因突变是否对 CHD 具有致病意义尚需要进一步的研究。本研究未发现 LMNA 基因的致病性突变, 笔者认为可能与以下几个因素有关: ①前期发现的 LMNA 基因突变伴有其他心脏、神经、肌肉、脂肪代谢障碍等病变, 而本研究中患者具有这些病变的比例较低; ② LMNA 基因的突变在先天性心脏病中较为罕见, 其突变可能并非是导致先天性心脏病的原因; ③研究的样本数量还不够大, 后续如果有更大的样本量也许能发现 LMNA 基因的其他致病性突变。

参考文献

- van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, *et al.* The changing epidemiology of congenital heart disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(1): 50-60
- Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, *et al.* Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(21): 2183-2242
- Chen J, Sun F, Fu J, *et al.* Association of TBX20 gene polymorphism with congenital heart disease in Han Chinese neonates [J]. *Pediatr Cardiol*, 2015, 36(4): 737-742
- 高莉洁, 赵仲堂, 李栋, 等. 先天性心脏病环境危险因素病例对照研究[J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(2): 161-162

(转第 65 页)

动态监测脂肪肝患者的肝脏损伤、代谢紊乱及其相关并发症情况。而没有肥胖这一危险因素的非肥胖型 NAFLD 患者,其缺少特异性临床表现及检查指标,易被人们忽视。因此对非肥胖型 NAFLD 的进一步认识有助于提供特异性的预防、治疗非肥胖型 NAFLD。

参考文献

- 1 Leung C, Yeoh SW, Patrick D, *et al.* Characteristics of hepatocellular carcinoma in cirrhotic and non - cirrhotic non - alcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2015,21(4):1189 - 1196
- 2 Malhotra N, Beaton MD. Management of non - alcoholic fatty liver disease in 2015[J]. *World J Hepatol*, 2015,7(30):2962 - 2967
- 3 Feng RN, Du SS, Wang C, *et al.* Lean - non - alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(47):17932 - 17940
- 4 Leung JC, Loong TC, Wei JL, *et al.* Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients[J]. *Hepatology*, 2017,65(1):54 - 64
- 5 Akyuz U, Yesil A, Yilmaz Y. Characterization of lean patients with nonalcoholic fatty liver disease: potential role of high hemoglobin levels[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2015,50(3):341 - 346
- 6 Hagström H, Nasr P, Ekstedt M, *et al.* Risk for development of severe liver disease in lean patients with nonalcoholic fatty liver disease: a long - term follow - up study[J]. *Hepatol Commun*, 2018,2(1):48 - 57
- 7 Cusi K. Nonalcoholic steatohepatitis in nonobese patients: not so different after all[J]. *Hepatology*, 2017,65(1):4 - 7
- 8 Fan JG, Peng YD. Metabolic syndrome and non - alcoholic fatty liver disease: Asian definitions and Asian studies[J]. *Hepatobi Pancreat Dis Int*, 2007,6(6):572 - 578
- 9 Cross TJ, Calvaruso V, Foxton MR, *et al.* A simple, noninvasive test for the diagnosis of liver fibrosis in patients with hepatitis C recurrence after liver transplantation[J]. *J Viral Hepatit*,2010,17(9):640 - 649
- 10 Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, *et al.* Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection[J]. *Hepatology*, 2006,43(6):1317 - 1325
- 11 Angulo P, Hui JM, Marchesini G, *et al.* The NAFLD fibrosis score:

- a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD[J]. *Hepatology*, 2007,45(4):846 - 854
- 12 Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, *et al.* Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease[J]. *Gut*, 2008,57(10):1441 - 1447
- 13 Du D, Zhu X, Kuno A, *et al.* Comparison of LecT - Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels[J]. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 2012,413(21 - 22):1796 - 1799
- 14 Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, *et al.* Epidemiology and natural history of non - alcoholic fatty liver disease[J]. *Metabolism*, 2016,65(8):1017 - 1025
- 15 Honda Y, Yoneda M, Kessoku T, *et al.* Characteristics of non - obese non - alcoholic fatty liver disease: effect of genetic and environmental factors[J]. *Hepatol Res*, 2016,46(10):1011 - 1018
- 16 Ha Y, Seo N, Shim JH, *et al.* Intimate association of visceral obesity with non - alcoholic fatty liver disease in healthy Asians: a case - control study[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015,30(11):1666 - 1672
- 17 Jaworski K, Sarkadi - Nagy E, Duncan RE, *et al.* Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2007,293(1):1 - 4
- 18 Nakamuta M, Kohjima M, Higuchi N, *et al.* The significance of differences in fatty acid metabolism between obese and non - obese patients with non - alcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Med*, 2008,22(5):663 - 637
- 19 Feldman A, Eder SK, Felder TK, *et al.* Clinical and metabolic characterization of lean caucasian subjects with non - alcoholic fatty liver[J]. *Am J Gastroenterol*, 2017,112(1):102 - 110
- 20 Moore JB. Non - alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome[J]. *Proc Nutr Soc*, 2010,69(2):211 - 220
- 21 Badoud F, Perreault M, Zulyniak MA, *et al.* Molecular insights into the role of white adipose tissue in metabolically unhealthy normal weight and metabolically healthy obese individuals[J]. *FASEB J*, 2015,29(3):748 - 758

(收稿日期:2019 - 01 - 15)

(修回日期:2019 - 02 - 21)

(接第 68 页)

- 5 Cao K, Capell BC, Erdos MR, *et al.* A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson - Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007,104(12):4949 - 4954
- 6 Lee S, Jung Y, Yoon M, *et al.* Interruption of progerin - lamin A/C binding ameliorates Hutchinson - Gilford progeria syndrome phenotype[J]. *J Clin Invest*,2016,126(10):3879 - 3893
- 7 Lai FP, Lau ST, Wong JK, *et al.* Correction of hirschsprung - associated mutations in human induced pluripotent stem cells via clustered regularly interspaced short palindromic repeats/cas9, restores neural crest cell function[J]. *Gastroenterology*,2017,153(1):139 - 153, e8
- 8 Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation[J]. *Annu Rev Biochem*,2015,84:131 - 164
- 9 Ho CY, Lammerding J. Lamins at a glance[J]. *J Cell Sci*,2012,125

(Pt 9):2087 - 2093

- 10 Wilson KL, Foisner R. Lamin - binding proteins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010,2(4):a000554
- 11 Shin JW, Spinler KR, Swift J, *et al.* Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013,110(47):18892 - 18897
- 12 Ostlund C, Worman HJ. Nuclear envelope proteins and neuromuscular diseases[J]. *Muscle Nerve*,2003,27(4):393 - 406
- 13 Yin J, Yang J, Ren FX, *et al.* Association of the LMNA gene single nucleotide polymorphism rs4641 with dilated cardiomyopathy[J]. *Genet Mol Res*,2015,14(4):15427 - 15434
- 14 Song K, Dube MP, Lim J, *et al.* Lamin A/C mutations associated with familial and sporadic cases of dilated cardiomyopathy in Koreans[J]. *Exp Mol Med*,2007,39(1):114 - 120

(收稿日期:2019 - 02 - 19)

(修回日期:2019 - 02 - 21)