

[文章编号] 1674-8115(2011)09-1240-05

· 论著 ·

单纯性动脉导管未闭患儿 TFAP-2B 基因单核苷酸多态性分析

陈轶维¹, 赵武², 李奋¹, 吉炜¹, 傅启华³, 张志芳¹, 王剑³

(1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心心内科, 上海 200127; 2. 蚌埠医学院附属第一医院儿科, 蚌埠 233004; 3. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心转化医学研究所, 上海 200127)

[摘要] 目的 探讨 TFAP-2B 基因 c.1-34G > A 和 c.539 + 62G > C 多态性与单纯性动脉导管未闭(PDA)发生的关系, 探索 PDA 发生的可能分子生物学机制。方法 以 100 例诊断明确的单纯性 PDA 患儿(PDA 组)为研究对象, 100 名健康儿童为对照组。采用 PCR 扩增 TFAP-2B 基因的全部外显子和外显子侧翼至少 50 bp 内含子, 所有扩增片段均进行双向测序。将所测 TFAP-2B 基因序列与 GenBank 中的已知序列(登录号:NG_008438)通过 BLAST 程序进行对比, 以检出可能存在的单核苷酸多态(SNP)。结果 在 PDA 组和对照组中检出 TFAP-2B 基因 2 个新的 SNP, 现有 NCBI 和 GenBank 收录资料未见报道, 即位于编码区上游第 34 位鸟嘌呤变为腺嘌呤 c.1-34G > A 和第 2 外显子下游第 62 位鸟嘌呤变为胞嘧啶 c.539 + 62G > C。c.1-34G > A 在 PDA 组的等位基因频率和基因型频率均高于对照组(等位基因频率比较: $Z = -2.513, P = 0.012$; 基因型频率比较: $Z = -2.680, P = 0.007$); c.539 + 62G > C 等位基因频率和基因型频率在两组间比较差异无统计学意义(等位基因频率比较: $Z = -0.332, P = 0.74$; 基因型频率比较: $Z = -0.129, P = 0.897$)。结论 TFAP-2B 基因 c.1-34G > A 多态与单纯性 PDA 发生有关, 可能是 PDA 发生的易感因素之一。

[关键词] 先天性心脏病; 动脉导管未闭; TFAP-2B 基因; 单核苷酸多态性

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.09.006

[中图分类号] R726.2

[文献标志码] A

Single nucleotide polymorphisms of TFAP-2B gene in children with patent ductus arteriosus

CHEN Yi-wei¹, ZHAO Wu², LI Fen¹, JI Wei¹, FU Qi-hua³, ZHANG Zhi-fang¹, WANG Jian³

(1. Department of Cardiology, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Department of Pediatrics, The First Hospital Affiliated to Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 3. Institute of Translational Medicine, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between c.1-34G > A and c.539 + 62G > C polymorphisms of TFAP-2B gene and patent ductus arteriosus (PDA), and explore the possible molecular biological pathogenesis of PDA. **Methods** One hundred children confirmed with PDA were selected as study objectives (PDA group), and another 100 healthy children were served as control group. PCR was employed to amplify all the exons and flanking introns (50 bp at least) of TFAP-2B gene, and direct forward and reverse sequencing of the PCR products was performed. The acquired sequences of TFAP-2B gene were aligned with those in GenBank (Accession Number: NG_008438) by BLAST program to detect the possible single nucleotide polymorphisms (SNP). **Results** Two novel SNP of TFAP-2B gene (c.1-34G > A and c.539 + 62G > C) were detected in PDA group and control group, which were not included in NCBI and GenBank. The frequencies of allele and genotype of c.1-34G > A in PDA group were significantly higher than those in control group (allele frequency: $Z = -2.513, P = 0.012$; genotype frequency: $Z = -2.680, P = 0.007$). There was no significant difference in the frequencies of allele and genotype of c.539 + 62G > C between two groups (allele frequency: $Z = -0.332, P = 0.74$; genotype frequency:

[基金项目] 上海高校创新团队发展计划(沪教委科 2010 年 29 号文); 国家重点基础研究发展计划(“九七三”计划)(2010CB529501)(Shanghai College Innovation Group Development Program of Shanghai Education Committee, No. 29, 2010; National Key Basic Research Development Program, “973” Program, 2010CB529501)。

[作者简介] 陈轶维(1985—), 男, 硕士生; 电子信箱: kaixinguooc@ hotmail. com。

[通信作者] 李奋, 电子信箱: lifen_88@yahoo. com. cn。

$Z = -0.129, P = 0.897$)。Conclusion c. 1-34G > A polymorphism of TFAP-2B gene may be associated with PDA, which may be a risk factor for PDA。

[Key words] congenital heart disease; patent ductus arteriosus; TFAP-2B gene; single nucleotide polymorphism

动脉导管未闭 (patent ductus arteriosus, PDA) 作为一类常见的先天性心脏病,在足月活产新生儿中的发病率约为 0.05%,占先天性心脏病的 10% 左右,早产、出生后缺氧、高原低氧、遗传因素等都可能造成 PDA 的发生^[1-3]。2008 年,Khetyar 等^[4]的研究证实,TFAP-2B 基因突变可导致单纯性 PDA 的发生;之后,国内研究^[5]同样证实 TFAP-2B 基因突变可导致家族遗传性 PDA。自从人类基因组计划实施开始,已认识到位于编码区的单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 可能导致蛋白质结构和功能的改变,而位于非编码区即内含子区的 SNP 近年来也多次被证明可影响基因的转录,从而导致表型改变以致疾病的发生^[6-8]。因此,无论是位于外显子区还是内含子区,SNP 都可能成为疾病遗传易感性的物质基础;SNP 可能与特定条件因素发生协同作用,通过单一作用致病^[9]。如上所述,TFAP-2B 基因 SNP 同样有可能在 PDA 的发生过程中发挥作用;因此,除了关注 TFAP-2B 突变致家族遗传性 PDA 外,还应对 PDA 患者 TFAP-2B 基因可能存在的 SNP 进行探索。

1 对象与方法

1.1 对象

收集 2010 年 6—12 月在上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心诊断为 PDA 的患儿 100 例 (PDA 组),其中男性 38 例,女性 62 例;年龄为 7 个月~11 岁,平均年龄为 (3.64 ± 2.67) 岁。入选标准:二维超声心动图检查明确主动脉与肺动脉或肺动脉分支间动脉导管开放,彩色多普勒超声可见动脉导管内血流信号,同时排除 PDA 合并其他类型先天性心脏缺陷。同期 100 名门诊体检健康儿童入

选对照组,经超声心动图检查证实心脏结构正常,其中男性 44 例,女性 56 例;平均年龄 (4.93 ± 1.14) 岁。PDA 组与对照组间男女性别比差异无统计学意义 ($P > 0.05$);PDA 组平均年龄小于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究获得上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心医学伦理委员会批准。经知情同意后,采集研究对象外周静脉血 2 mL,置于柠檬酸钠抗凝管中,混匀后 -80 ℃ 冰箱冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 采用德国 Qiagen 公司全血基因组 DNA 试剂盒抽提外周静脉血基因组 DNA,操作流程按照试剂盒说明书进行。将得到的 DNA 样本置于 -20 ℃ 冰箱备用。

1.2.2 TFAP-2B 基因扩增 根据 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.gov>) 中 TFAP-2B 基因的序列,利用 Primer3.0 软件 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 在线设计 7 对引物,所有引物均包含外显子和侧翼部分内含子,由上海天昊生物科技有限公司合成。引物序列及扩增片段长度见表 1。以研究对象的基因组 DNA 为模板,应用德国 Qiagen 公司 HotStar Taq 聚合酶等 PCR 试剂,使用上述 7 对引物通过 PCR 反应扩增全部外显子及外显子侧翼部分至少 50 bp 内含子进行扩增。PCR 反应体系为 25 μL,其中 10 × Buffer 2.5 μL,dNTP 2 μL,基因组 DNA (100 ng/μL) 1 μL,上游、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL,HotStar Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,双蒸水 17.25 μL。反应参数如下:95 ℃ 预变性 5 min;随后 95 ℃ 变性 30 s、62 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环。PCR 产物通过 0.9% 琼脂糖凝胶电泳后观察并记录目的条带。

表 1 TFAP-2B 基因扩增引物序列
Tab 1 Primer sequences of TFAP-2B gene

外显子	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	扩增片段长度/bp
1	TTTGCTGTATCCCCATT	GAGAAAACCGACGGAAATC	248
2	TCAGATGCTGCTTGGCTTGC	ACCTCTGAAATCCGCACTA	825
3	GCATCCGAGATCTCTCTCAA	GCCCTTTCCGCTAATCTGAC	447
4	ACTTGGTCCCTGAGCTTCCG	AGCAAAACCCAATCTGCCAGT	413
5	AAGGAAGGGGGAAAAATGTG	TATGAGCTGGATGTCAAGCG	344
6	AGCTGGCCTCTCTGGAAAT	AATCCGAATCGAGCCTTCTT	432
7	CCACATTAGCCTCGCTTTC	AAAACGTAGGGGTAGAACGG	604

1.2.3 TFAP-2B 基因测序 TFAP-2B 基因组 DNA 的 PCR 产物送上海天昊生物科技有限公司双向测定序列。采用 Chromas 2.21 软件观察测序结果, 利用 NCBI BLAST 程序将测序结果与 GenBank 人 TFAP-2B 基因组 DNA 序列(登录号: NG_008438)进行对比, 分析有无碱基变化。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件包进行统计学分析, 以非参数检验法(Mann-Whitney U 检验)分析等位基因及各基因型在 PDA 组和对照组间的频率分布。双侧统计量值 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TFAP-2B 基因扩增产物

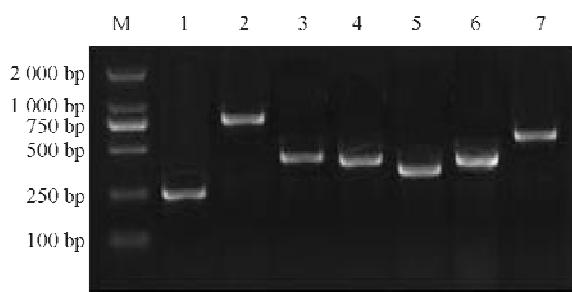
TFAP-2B 基因扩增产物电泳见图 1。

2.2 识别出的新的 TFAP-2B 基因多态

在 TFAP-2B 基因中识别出 2 个新的 SNP, 即位于编码区上游第 34 位鸟嘌呤变为腺嘌呤 c. 1-34G > A 和第 2 外显子下游第 62 位鸟嘌呤变为胞嘧啶 c. 539 + 62G > C, NCBI 及 GenBank 收录资料未见报

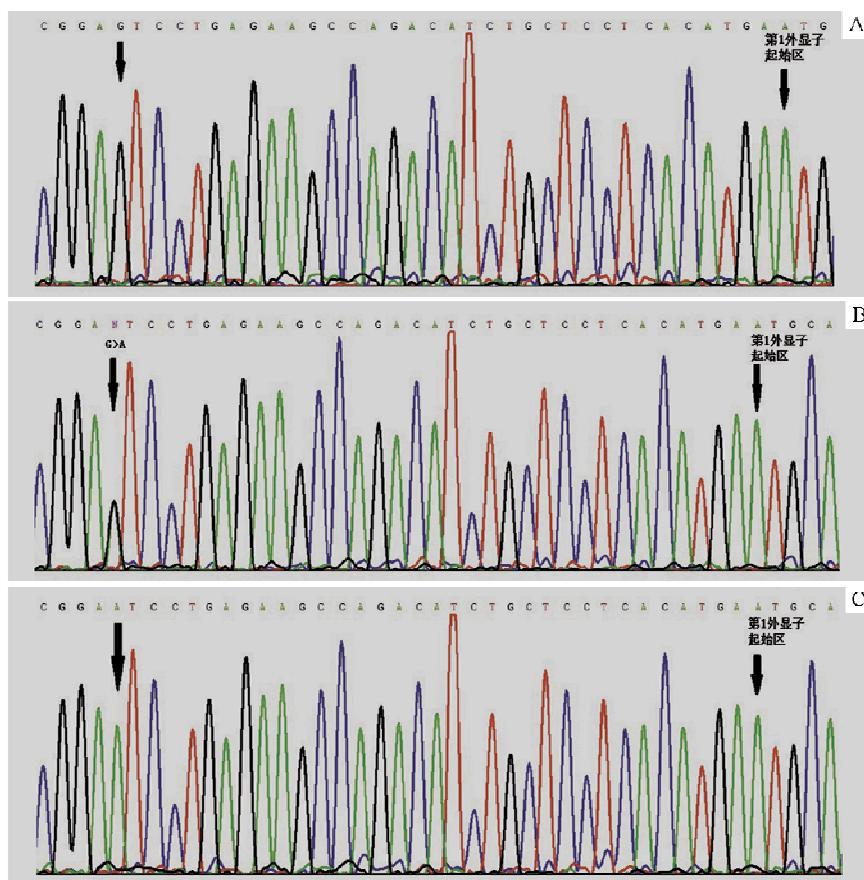
道。多态序列见图 2、3。

c. 1-34G > A 等位基因 G、A 及其构成的 3 种基因型 GG、GA、AA 在 PDA 组和对照组间的频率分布差异有统计学意义(等位基因频率比较: $Z = -2.513$, $P = 0.012$; 基因型频率比较: $Z = -2.680$, $P = 0.007$) (表 2)。c. 539 + 62G > C 等位基因频率及基因型频率在两组间的差异无统计学意义(等位基因频率比较: $Z = -0.332$, $P = 0.74$; 基因型频率比较: $Z = -0.129$, $P = 0.897$) (表 3)。



注: M 表示 Marker; 1~7 表示 TFAP-2B 基因扩增产物。

Fig 1 Electrophoretogram of amplification products of TFAP-2B gene



A. 纯合子 GG; B. 杂合子 GA; C. 纯合子 AA。

图 2 TFAP-2B 基因 c. 1-34G > A 多态序列

Fig 2 Polymorphic sequences of c. 1-34G > A in TFAP-2B gene

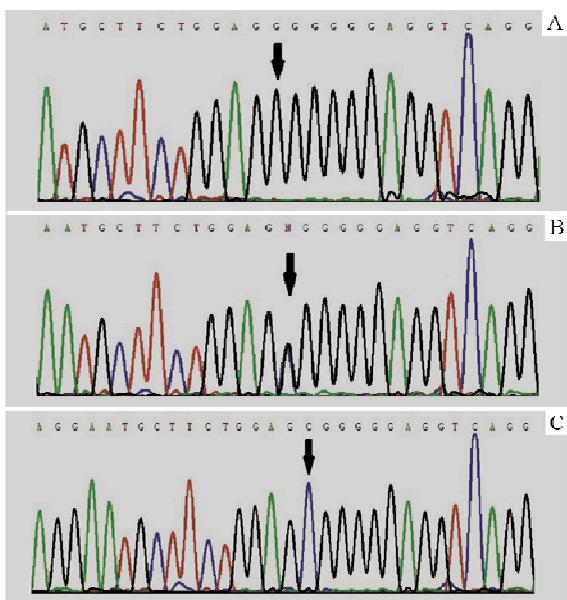


图3 TFAP-2B基因c. 539 + 62G > C多态序列

Fig 3 Polymorphic sequences of c. 539 + 62G > C in TFAP-2B gene

表2 PDA组和对照组c. 1-34G > A基因型和等位基因频率分布
Tab 2 Frequencies of genotype and allele of c. 1-34G > A in two groups

组别	基因型频率			等位基因频率	
	GG	GA	AA	G	A
PDA组(n=100)	48	44	8	140	60
对照组(n=100)	63	37	0	163	37

表3 PDA组和对照组c. 539 + 62G > C基因型和等位基因频率分布
Tab 3 Frequencies of genotype and allele of c. 539 + 62G > C in two groups

组别	基因型频率			等位基因频率	
	GG	GC	CC	G	C
PDA组(n=100)	66	32	2	164	36
对照组(n=100)	63	37	0	163	37

3 讨论

过去,人们通常把内含子看作是DNA通过膨胀缓解进化压力的缓冲带,并不认为内含子具有其他实际功能。研究表明非编码区在细菌中只占整个基因组序列的10%~20%,而在人类则占95%左右。同时,作为非编码序列重要成分之一的内含子与生物等级有相关性。从生物进化的角度来看,内含子在生命活动中必定执行着某种或某些特殊功能。对内含子一维序列结构和信息结构及生物功能的研究已经取得一些结果,越来越多的研究^[6~8]发现:内含子与基因转录调控有关,如内含子增强效应以及充

当增强子、启动子、介导因子等,而且还有一些其他基因和假基因由内含子来编码。此外,内含子还具有选择剪接功能,也叫基因的选择性转录。由于内含子的存在,使选择剪接成为可能,从而可以由同一个基因产生功能不同甚至相反的蛋白^[10~11]。

TFAP-2B基因定位于人类染色体6q12,包含7个外显子,主要负责合成神经管嵴相关转录蛋白。TFAP家族蛋白产物在结构上呈现高度保守性,从斑马鱼、大鼠到人类,其C端基本都含有helix-span-helix二聚体区域和包括GCCN3/4GGC共有序列在内的DNA结合区域。TFAP-2B蛋白产物往往通过与其他转录蛋白形成异源二聚体调控下游基因的表达,参与哺乳动物心脏、肾脏、神经管等多组织器官的生长发育,调控相关细胞的增殖及凋亡^[12~18]。目前,对于TFAP-2B基因突变致PDA发生的机制,主要集中于Satoda等提出的显性抑制和Mani等提出的单倍型效率不足假说^[12~15]。国内曾报道^[5],TFAP-2B基因c. 601 + 5G > A突变可致家族遗传性PDA的发生,其机制仍倾向于内含子选择性剪切从而影响TFAP-2B正常功能。在此项研究中,c. 601 + 5G > A突变即发生在TFAP-2B基因第3内含子剪接位点+5位碱基,即内含子区,c. 601 + 5G > A突变可能激发了该潜在剪接位点,造成第3外显子异常拼接,导致PDA的发生。

本研究中所发现的c. 1-34G > A即位于mRNA内含子区,TFAP-2B基因中该位点SNP为首次报道。根据基因型统计结果分析,由A等位基因及其构成的AG、AA基因型在PDA组的分布频率高于对照组。尽管该SNP位于非编码区,但根据一般分子生物学规律,真核生物编码区上游200 bp内极有可能包含该基因的启动子及转录因子结合位点或其他调控元件。此外,Tsukada等^[19]在有关TFAP-2B基因多态性与2型糖尿病的研究中曾发现TFAP-2B部分内含子位点SNP可改变TFAP-2B转录活性,并进一步影响下游基因的转录。因此,该SNP位点可能位于TFAP-2B启动子或转录因子结合位点内,c. 1-34G > A的改变将导致基因构型发生变化,进而影响TFAP-2B转录活性,成为PDA发生的一个危险因素或潜在病因之一。

另一SNP为c. 539 + 62G > C,其发生率在PDA组与对照组之间比较差异无统计学意义,故可被视为TFAP-2B基因SNP之一。以目前的统计数据无法说明其对PDA的发生可能产生影响;在以后的研究

中,可扩大 PDA 组和对照组人数,进一步进行分析,明确其性质。

综上所述,本研究通过分子生物学技术发现了 TFAP-2B 基因 2 个全新的 SNP,即 c. 1-34G > A 和 c. 539 + 62G > C。初步的统计分析表明,c. 1-34G > A 在 PDA 人群中的发生率高于正常人群,结合其所在转录起始位点上游 mRNA 区域,说明该 SNP 可能在 PDA 的发生过程中起一定作用。而 c. 539 + 62G > C 在 PDA 患者和正常人群中的分布无明显差异,可视为 TFAP-2B 的正常 SNP 之一。

[参考文献]

- [1] Forsey JT, Elmasry OA, Martin RP. Patent arterial duct [J]. Orphanet J Rare Dis, 2009, 4: 17.
- [2] Schneider DJ, Moore JW. Patent ductus arteriosus [J]. Circulation, 2006, 114(17): 1873–1882.
- [3] Hamrick SE, Hansmann G. Patent ductus arteriosus of the preterm infant [J]. Pediatrics, 2010, 125(5): 1020–1030.
- [4] Khetyar M, Syrris P, Tinworth L, et al. Novel TFAP2B mutation in nonsyndromic patent ductus arteriosus [J]. Genet Test, 2008, 12(3): 457–459.
- [5] 陈铁维,赵武,李奋,等.动脉导管未闭患儿TFAP-2B 基因突变的研究[J].中华儿科杂志,2010,48(12): 900–904.
- [6] Rogic S, Montpetit B, Hoos HH, et al. Correlation between the secondary structure of pre-mRNA introns and the efficiency of splicing in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. BMC Genomics, 2008, 29(9): 355.
- [7] Lev-Maor G, Ram O, Kim E, et al. Intronic Alus influence alternative splicing [J]. PLoS Genet, 2008, 4(9): e1000204.
- [8] Fox-Walsh KL, Dou Y, Lam BJ, et al. The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing [J]. PNAS, 2005, 102(45): 16176–16181.
- [9] Waleh N, Hodnick R, Jhaveri N, et al. Patterns of gene expression in the ductus arteriosus are related to environmental and genetic risk factors for persistent ductus patency [J]. Pediatr Res, 2010, 68(4): 292–297.
- [10] Mikol DD, Rongnparut P, Allwardt BA, et al. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein of mouse: primary structure and gene structure [J]. Genomics, 1993, 17(3): 604–610.
- [11] Howe KJ, Ares M Jr. Intron self-complementarity enforces exon inclusion in a yeast pre-mtRNA [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(23): 12467–12472.
- [12] Satoda M, Pierpont ME, Diaz GA, et al. Char syndrome, an inherited disorder with patent ductus arteriosus, maps to chromosome 6p12-p21 [J]. Circulation, 1999, 99(23): 3036–3042.
- [13] Satoda M, Zhao F, Diaz GA, et al. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 42–46.
- [14] Mani A, Radhakrishnan J, Farhi A, et al. Syndromic patent ductus arteriosus: evidence for haploinsufficient TFAP2B mutations and identification of a linked sleep disorder [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(8): 2975–2979.
- [15] Zhao F, Weismann GG, Satoda M, et al. Novel TFAP2B mutations that cause Char syndrome provide a genotype-phenotype correlation [J]. Am J Hum Genet, 2001, 69(4): 695–703.
- [16] Moser M, Pscherer A, Roth C, et al. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta [J]. Genes Dev, 1997, 11(15): 1938–1948.
- [17] Moser M, Dahmen S, Kluge R, et al. Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2 beta [J]. Lab Invest, 2003, 83(4): 571–578.
- [18] Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, et al. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control [J]. Gene, 2000, 260(1–2): 1–12.
- [19] Tsukada S, Tanaka Y, Maegawa H, et al. Intronic polymorphisms within TFAP2B regulate transcriptional activity and affect adipokine gene expression in differentiated adipocytes [J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(5): 1104–1111.

[收稿日期] 2011-03-03

[本文编辑] 吴洋