

## 论著·临床研究

完全性肺静脉异位引流患儿的 *ARHGEF16* 基因突变筛查及突变功能分析

王 静, 金理辉, 张 琪, 孙 锐, 于 昱

上海交通大学医学院附属新华医院小儿心血管科, 心血管发育与再生医学研究所, 上海 200092

**[摘要]** **目的**·探究完全性肺静脉异位引流 (total anomalous pulmonary venous connection, TAPVC) 的发病机制, 通过全外显子测序筛查出致病基因 *ARHGEF16*, 并对其进行功能验证。**方法**·收集 78 例 TAPVC 患儿及 100 例正常对照儿童的血液、临床资料及辅助检查结果, 抽提全血 DNA 进行 *ARHGEF16* 突变筛查。构建 *ARHGEF16* 野生型及突变型表达质粒, 转染 293T 细胞, 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 分别检测 mRNA 和蛋白的表达水平; 通过软件 Cytoscape 进行蛋白与蛋白之间的相互作用分析。**结果**·在 TAPVC 患儿中发现 *ARHGEF16* 基因 2 个未报道的突变位点 c.C236>T (A79V) 和 c.G619>C (G207R), 在对照组中未发现。与野生型相比, 突变型 *ARHGEF16* mRNA 和蛋白表达量均上调。蛋白相互作用分析显示, *ARHGEF16* 与 *RAC1* 可以直接相关联; 通过 RT-qPCR 检测, 发现在过表达 *ARHGEF16* 时, *RAC1* 表达上调。**结论**·*ARHGEF16* 的错义突变影响了 *ARHGEF16* mRNA 及蛋白表达水平, 过表达 *ARHGEF16* 可上调 *RAC1* 的表达, 提示其可能通过对 *RAC1* 的调控参与 TAPVC 的形成及发展。

**[关键词]** 完全性肺静脉异位引流; *ARHGEF16*; 错义突变; *RAC1*; 发育

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.01.011 **[中图分类号]** R725.4 **[文献标志码]** A

*ARHGEF16* variants screening and mutation function analysis for children with total anomalous pulmonary venous connection

WANG Jing, JIN Li-hui, ZHANG Qi, SUN Kun, YU Yu

Department of Pediatric Cardiology, Institute for Developmental and Regenerative Cardiovascular Medicine, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the pathogenesis of total anomalous pulmonary venous connection (TAPVC), and to identify *ARHGEF16* gene through full exon sequencing screening and analyze its mutation function. **Methods**·The blood, clinical data and auxiliary examination results of 78 children with TAPVC and 100 healthy controls were collected, and the genomic DNA was extracted for *ARHGEF16* mutation screening. *ARHGEF16* wild-type and mutant expression plasmids were constructed and transfected into 293T cells. mRNA and protein expression levels were detected by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western blotting, respectively. Protein-protein interaction exploration was performed by Cytoscape software. **Results**·Two novel variants c.C236>T (A79V) and c.G619>C (G207R) were found in TAPVC patients and were not found in healthy controls. Compared with the wild type, the mutants *ARHGEF16* were up-regulated in both mRNA and protein expression levels. Protein interaction analysis showed that *ARHGEF16* and *RAC1* were directly associated; *RAC1* expression was up-regulated in HEK293 cells with *ARHGEF16* overexpression through RT-qPCR. **Conclusion**·The missense mutations of *ARHGEF16* affect the mRNA and protein expression levels of *ARHGEF16*. Overexpression of *ARHGEF16* up-regulates the expression of *RAC1*, suggesting that it may participate in the development and formation of TAPVC by regulating *RAC1*.

**[Key words]** total anomalous pulmonary venous connection; *ARHGEF16*; missense mutations; *RAC1*; development

完全性肺静脉异位引流 (total anomalous pulmonary venous connection, TAPVC) 是一类罕见的先天性心脏病, 占先天性心脏病发病的 1.5% ~ 3%; 在活产婴儿中, 其发病率为 1/15 000<sup>[1-2]</sup>。目前, TAPVC 按病理解剖分型分为心上型、心内型、心下型及混合型。TAPVC 临床表现较

为严重, 患儿出现紫绀、心脏杂音, 常伴呼吸衰竭和心力衰竭等严重的症状而需要早期手术治疗; 如不早期手术, 80% 的患儿 2 岁内会死亡<sup>[3-4]</sup>。心脏超声往往可以明确诊断及分型。目前, 关于 TAPVC 的基因学研究报道较少, 主要通过散发病例进行生物信息学测序分析筛选候选致病

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81974021)。

**[作者简介]** 王 静 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: Awang\_J@163.com。

**[通信作者]** 于 昱, 电子信箱: yuyu@xinhumed.com.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81974021).

**[Corresponding Author]** YU Yu, E-mail: yuyu@xinhumed.com.cn.



基因, 且先天性心脏病由多基因导致, 病因复杂, 其发病机制尚未阐明。因而, 收集大量 TAPVC 样本进行生物学分析并研究其发病机制, 对于该病的诊断及预防具有重大的临床意义。

Nash 等<sup>[5]</sup>通过全基因组测序方法分析 2 例 TAPVC 患者, 发现视黄醇结合蛋白 5 (retinol binding protein 5, *RBP 5*) 基因存在突变。另有研究<sup>[6]</sup>通过全基因组测序方法检测 6 例 TAPVC 患者及 81 名对照, 发现激活素受体酶 1 (activin receptor like kinase 1, *ACVRL1*) 及肌三角 (sarcoglycan delta, *SGCD*) 2 个基因存在突变, 并在另外 12 例 TAPVC 患者中验证了这些突变。截止到目前, TAPVC 相关的高通量测序研究仍然很少, 其原因与该病发病率较低使得样本收集较为困难, 且该病有着较高的致死率使得早期临床诊断相对困难等有关。

2014—2019 年, 我们收集了 78 例散发 TAPVC 病例和 100 例正常健康儿童血液样本及完整的临床资料。血液样本通过抽提出 DNA 进行全外显子测序 (whole exome sequencing, WES) 以检测其可能的致病基因和突变位点。WES 是利用序列捕获技术将全基因组外显子区域 DNA 捕捉并富集后进行高通量测序的基因组分析方法, 是一种选择基因组的编码序列的高效策略, 对研究已知基因的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)、Indel 等具有较大的优势。为了明确 TAPVC 的致病基因, 我们通过 SNP-based 关联分析和 Gene-based 负荷分析等生物信息学手段对 WES 的数据进行分析处理, 最后初步筛选得到候选基因 Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子 16 (*ARHGEF16*)。 *ARHGEF16* 突变位点包括 c.C236>T (A79V) 和 c.G619>C (G207R)。 *ARHGEF16* 编码的蛋白功能尚不明确, 其参与蛋白质—蛋白质和蛋白质—脂质的相互作用; 可刺激 RHOG 相关 GDP 与 GTP 的交换, 介导 EPHA2 激活 RAC1 而在趋化细胞迁移中发挥作用, 也可以通过病毒蛋白 HPV16 E6.1 激活 CDC42 并介导 CDC42 的激活<sup>[7-8]</sup>。本研究主要根据 WES 进行生物信息学

分析<sup>[9]</sup>, 进一步对候选基因 *ARHGEF16* 在细胞中的突变功能进行分析, 并探讨其可能调控的下游靶基因, 以期阐明 TAPVC 发病遗传分子机制提供理论依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集在上海交通大学医学院附属新华医院及儿童医学中心通过心脏彩色超声、心导管、腹部超声、CT 或手术记录确诊为 TAPVC 的患儿血液标本 (病例组), 同时收集与病例组年龄和性别相匹配的健康儿童血液作为对照组。2014—2019 年获得病例组血浆 210 例, 对照组血浆 150 例。已完成生物样本采集和流行病学资料收集。研究获得医院伦理委员会审批, 伦理审查编号为 XHEC-C-2017-KJB-003。

### 1.2 方法

**1.2.1 TAPVC 可能致病基因的生物信息学分析** 对 78 例 TAPVC 患儿和 100 名正常对照儿童 WES 数据进行基于致病基因和致病 SNP 的关联分析, 获得 TAPVC 的可能致病的候选基因 *ARHGEF16*。在新增的 100 例患儿中作更高深度的目标区域靶向捕获测序以进行验证<sup>[9]</sup> (数据未显示)。

通过人群基因组数据库, 参考常见数据库包括 1000G、Kaviar、ExAC、ESP6500 等筛选出最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 小于 0.01 的罕见突变, 参考 SIFT、PolyPhen-2、Mutation Taster 等数据库筛选出致病可能性高的 *ARHGEF16* 的突变位点 C236T 和 G619C。随后, 评估变异在核苷酸或氨基酸水平造成的影响, 包括其引起的转录的变化以及对蛋白质功能的影响。

**1.2.2 *ARHGEF16* 突变位点的 Sanger 验证** 设计人类基因 *ARHGEF16* (NM\_014448.4) 特异性引物 (表 1), 以入选病例及对照样本 DNA 为模板, PCR 扩增特异性片段, Sanger 测序法验证变异位点。

表 1 引物序列  
Tab 1 Primers sequence

Number	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
1	GACCCACAGCCGCCAGCATGG	CTTGTTTTGGCCGGGCTCCG
2	TGTGGAGCCGAGAGGTCTCT	TGCCCTCTGATCTGGCCTTG
3	CAGAGAGCCCGGTGGCCCTCAAGCT	AGCTTGAGGGCCACCGGGCTCTCTG
4	AAACGTGGGCACAAGCGTTCTTCAAGACG	CGTCCTTGAAGGAACGCTTGTCCTACGTTT
5	GGGCGGCTGTACTTAGCAG	CGGTAGGATTGGTTCCGCA

**Note:** Primers 1 and 2 were for verifying *ARHGEF16* mutation sites c.C236>T and c.G619>C exon regions; primers 3 and 4 were aimed constructing plasmids with mutation sites at c.C236>T and c.G619>C, respectively; primer 5 was for quantitative real-time PCR (RT-qPCR).

**1.2.3 质粒构建** GV358-*ARHGEF16* 质粒购于吉凯基因生物公司。以野生型质粒为模板, 设计构建突变质粒的引物 (表 1)。用 KOD-Plus-Neo (TOYOBO) 酶对模板进行定点突变, 得到突变质粒 C236T、G619C。突变质粒送华大生物公司进行 Sanger 测序, 测序结果用 NCBI BLAST 网站与 GenBank 中 *ARHGEF16* 比较, 分析突变位置是否正确。

**1.2.4 细胞培养与转染** 人肾上皮细胞系 (293T) 购于中国科学院细胞库, 在含有 10% 胎牛血清 (MP Biomedicals) 和 1% 青霉素-链霉素混合液 (Gibco) 的高糖培养基中培养 (Hyclone)。培养条件设置为 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>。对数生长期时用 FuGene 转染试剂 (Promega) 转染空载 (GV358)、*ARHGEF16* 野生型质粒 (WT)、*ARHGEF16* 突变质粒 (C236T、G619C)。转染 48 h 后用 RT-qPCR 检测转染效率和 mRNA 表达量变化。

**1.2.5 RT-qPCR** 将 293T 细胞以  $4 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 6 孔板, 待细胞融合度达到 60% ~ 70% 时转染 GV358、WT、C236T 和 G619C。48 h 后用 TRIzol 裂解细胞提取 RNA。将 1 µg RNA 用 PrimeScript™ RT Master Mix (Takara) 反转录为 cDNA, RT-qPCR 采用 15 µL 体系, 包括 cDNA 为 2 µL, 正、反引物各 0.3 µL (引物序列见表 1),  $2 \times$  SYBR (Takara) 7.5 µL,  $50 \times$  ROX Dye II 0.3 µL 及 dd H<sub>2</sub>O 4.6 µL, 在 Applied Biosystems 7500 上进行反应, 按照预变性 95 °C 30 s, PCR 反应 95 °C 5 s、64 °C 34 s (40 个循环) 的条件进行扩增。*GAPDH* 作为内参。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对 *ARHGEF16* mRNA 表达量进行相对定量。

**1.2.6 蛋白质印迹法 (Western blotting)** 293T 细胞接种于 12 孔板并分别转染空载、WT-*ARHGEF16*、C236T 和 G619C。转染 48 h 后用 RIPA 和 PMSF 裂解细胞, 并收集

蛋白。用 BCA 试剂盒 (碧云天) 测浓度后加蛋白缓冲液 100 °C 变性 10 min。取 30 µg 上述变性蛋白样本进行 15% SDS-PAGE 电泳, 电转至硝酸纤维素膜上 (Millipore)。脱脂牛奶室温封闭 2 h, *ARHGEF16* 的一抗 (Proteintech) 和 anti-GAPDH 4 °C 孵育过夜。分别用山羊抗兔和抗鼠二抗室温孵育 2 h, ECL 发光试剂盒 (Millipore) 显影蛋白。

**1.2.7 生物信息学方法** 利用 STRING 软件 (<https://string-db.org/>) 进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析, 通过输入 *ARHGEF16* 和已知血管生成、TAPVC 等的相关基因, 预测 *ARHGEF16* 与其他基因编码的蛋白相互作用。用 Cytoscape 软件制作网络相互作用图 (<https://cytoscape.org/>), 从文献中挑选 100 个与血管发育、TAPVC 等相关的基因编码的蛋白与 *ARHGEF16* 进行相互作用分析。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。每个实验均进行 3 次独立的生物学重复。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 入选病例信息

入选的 2 例患儿经超声检查分别确诊为心上型和心内型的 TAPVC。入院时已经出现发绀、喂养困难及呼吸衰竭等症状。患儿父母否认有家族性先天性心脏病的病史。Mutation Taster 网站预测这 2 个突变位点均具有致病性, MAF 均小于 0.05, SIFT 评分分别为 0.12 和 0.38 (数值越小, 引起蛋白质功能改变的可能性越大)。2 例患儿具体病例信息如表 2 所示。

表 2 入选 TAPVC 患儿的临床信息和 *ARHGEF16* 突变位点的特征

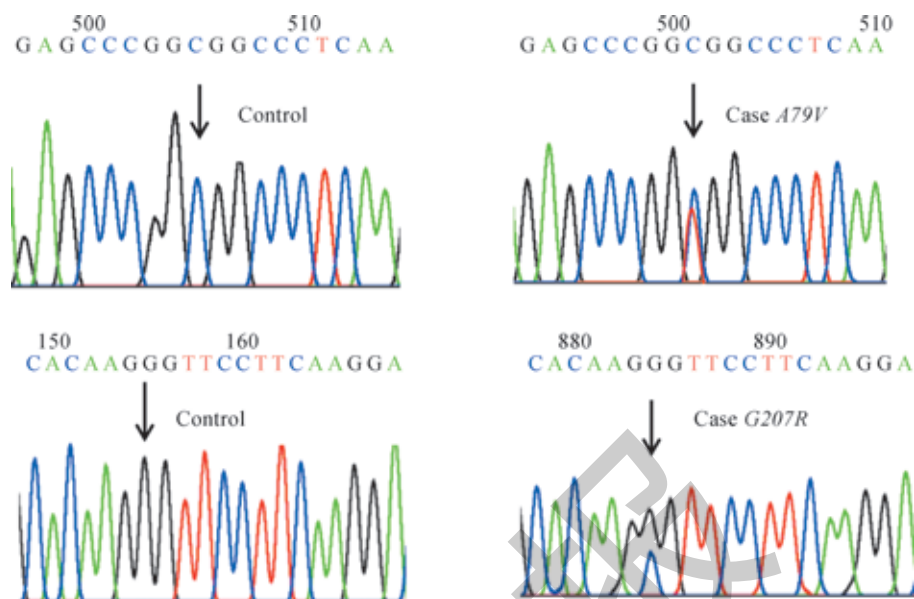
Tab 2 Clinical information and variant characteristics of *ARHGEF16* in TAPVC patients

Number	Gender	Age/month	Phenotype	Location in gene	Function	Nucleotide change	Amino acid change	SIFT score	Mutation Taster	Polyphen2	MAF
1	Male	3	Supracardiac	Exon 2	Missense	C236T	A79V	0.12	Disease causing	Tolerable	5.719e-05
2	Female	13	Cardiac	Exon 3	Missense	G619C	G207R	0.38	Disease causing	Probably harmful	5.063e-05

### 2.2 Sanger 测序结果和突变保守性分析

Sanger 测序结果显示入选的 2 例患儿第 2、3 外显子区 c.C236T、c.G619C 的改变导致第 79 位氨基酸从丙氨酸

(GCG) 变成缬氨酸 (GGT), 第 207 位氨基酸从甘氨酸变成精氨酸, 且这 2 个杂合突变位点在正常对照组中未发现 (图 1)。



**Note:** The arrows indicated the mutation sites, and the case groups showed the change of heterozygosome peak.

图 1 病例组及对照组儿童的 *ARHGEF16* 测序峰图

Fig 1 Sequence chromatograms of *ARHGEF16* missense variants in patients and controls

另外，我们发现这 2 个突变位点在人类、豚尾猴、褐家鼠等脊椎动物中具有共同的保守序列，表明这 2 个位点

具有重要的作用，其突变可能导致 *ARHGEF16* 功能的改变（图 2）。



**Note:** The sequences of two mutation sites were highly conserved among different species.

图 2 *ARHGEF16* 在不同物种之间的编码蛋白质序列

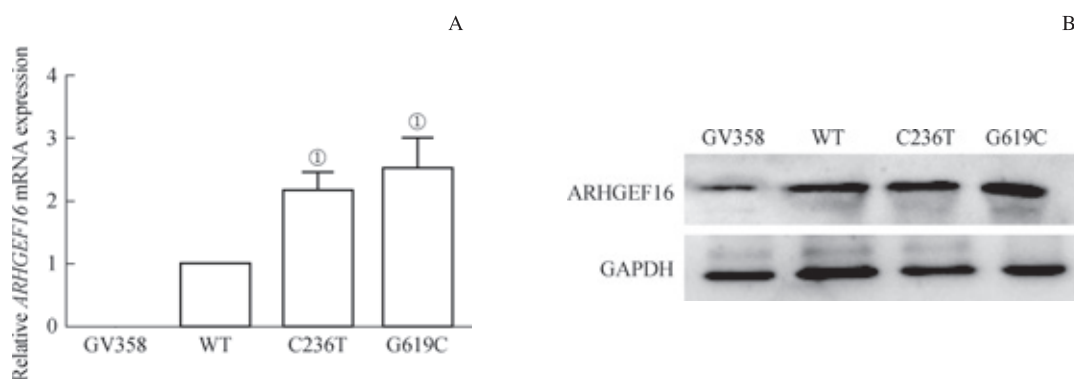
Fig 2 Conservation of *ARHGEF16* variants among different species

### 2.3 *ARHGEF16* mRNA 和蛋白表达量分析

通过 RT-qPCR 分析 WT、突变型 C236T 和 G619C 组 *ARHGEF16* mRNA 表达量差异。结果如图 3A 所示，较 WT 组相比，C236T 和 G619C 组 *ARHGEF16* mRNA 表达量显著上调 ( $P=0.001$ )。Western blotting 结果显示，与

WT 组相比，C236T 和 G619C 组 *ARHGEF16* 蛋白表达量上调显著 ( $P=0.002$ ,  $P=0.001$ )，其相对表达量分别为 WT 组的 1.9 和 2.2 倍，表明这 2 个位点的错义突变对蛋白表达量产生影响（图 3B）。





Note: A. RT-qPCR. B. Western blotting. <sup>①</sup>  $P=0.001$ , vs WT group.

图3 *ARHGEF16* mRNA和蛋白表达分析 ( $n=3$ )

Fig 3 Analysis of mRNA and protein expression of *ARHGEF16* ( $n=3$ )

## 2.4 *ARHGEF16* 与编码血管发育相关基因的蛋白相互作用分析

*ARHGEF16* 位于1号染色体, 由15个外显子和14个内含子组成, 可以促进人脑胶质瘤细胞的迁移<sup>[10-11]</sup>。Cytoscape结果显示*ARHGEF16*与*RAC1*存在直接关联(图4), 可能通过*RAC1*与其他血管发育类基因相互作用, 其中*VAV2*和*KDR*是已知的TAPVC可能致病候选基因<sup>[9]</sup>, 从而最终在TAPVC的发育形成过程中发挥重要作用。

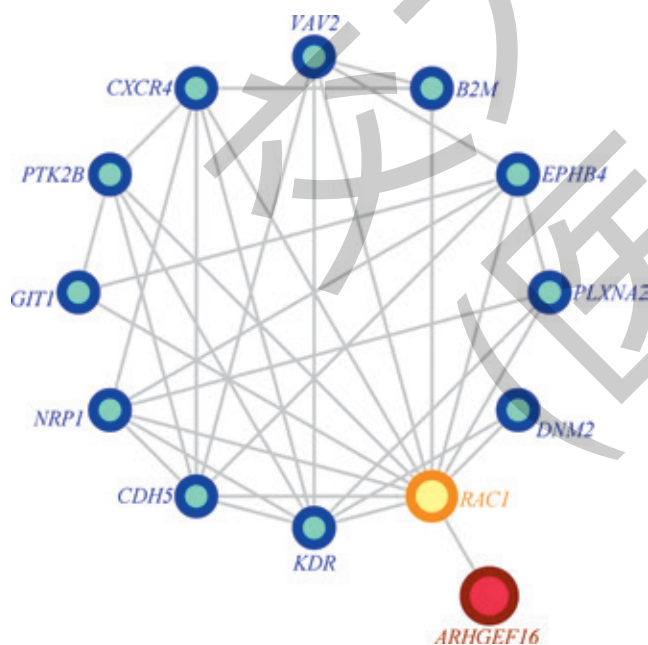


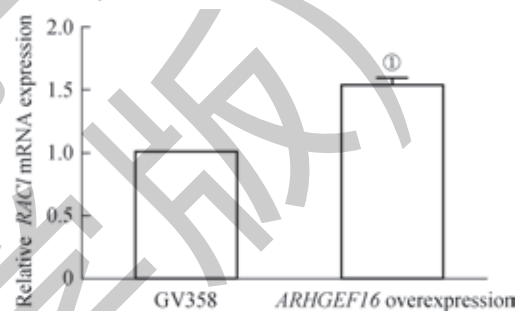
图4 *ARHGEF16*和其他血管类相关基因之间的蛋白相互作用网络图

Fig 4 Protein-protein interaction network between *ARHGEF16* and other genes with angiogenic functions

## 2.5 *ARHGEF16* 过表达对 *RAC1* mRNA 表达量影响

蛋白相互作用分析结果显示, *ARHGEF16*与*RAC1*存在直接相互作用。用*ARHGEF16*质粒转染293T细胞, 收

集细胞RNA, 通过RT-qPCR分析*ARHGEF16*对*RAC1* mRNA表达调控。结果如图5所示, *ARHGEF16*过表达时*RAC1*的表达量上调( $P=0.006$ )。



Note: <sup>①</sup>  $P=0.006$ , vs GV358 group.

图5 *ARHGEF16* 过表达对 *RAC1* 表达的影响

Fig 5 Analysis of *RAC1* mRNA expression in HEK293 cells with *ARHGEF16* overexpression

## 3 讨论

TAPVC患儿出生后往往出现青紫、呼吸急促、喂养困难、日益加重的心力衰竭, 如不给予治疗, 多在3个月左右死亡。然而, TAPVC的发病机制尚不明确, Neill等<sup>[12]</sup>1960年首次在弯刀综合征中描述了TAPVC。随后, 遗传学研究表明, TAPVC为常染色体显性遗传, 具有不完全外显率及可变表达特性。有研究<sup>[13-14]</sup>表明, 编码血管内皮生长因子受体2的基因(*KDR*)和编码血小板衍生生长因子受体 $\alpha$ (*PDGFRA*)的基因参与TAPVC的发生。*PDGFRA*基因在小鼠心系膜中被敲除后, 出现TAPVC的表型, 表明基因*PDGFRA*确实与TAPVC的发生有关<sup>[15-16]</sup>。此外, 从TAPVC患者分离出的外周血淋巴细胞中发现基因锚链重复域1(*ANKRD1*)表达量明显增加, 提示*ANKRD1*的过表达也与TAPVC的发生相关。Degenhardt

等<sup>[17]</sup>发现, 轴突向导因子 3d (Semaphorin 3d, *SEMA3D*) 基因突变小鼠具有 TAPVC 的表型。

迄今为止, 关于 TAPVC 的基因学研究甚少。我们收集较大样本量——78 例散发 TAPVC 病例和 100 例健康儿童, 通过抽提全血 DNA 进行 WES 以检测其可能的致病基因和致病突变。通过 SNP-based 关联分析和 Gene-based 负荷分析等生物信息学方法对 WES 的数据进行分析处理, 筛选出基因 *ARHGEF16*, 其具有 2 个突变位点 (c.C236T:p.A79V 和 c.G619C:p.G207R)。通过 Mutation Taster 在线预测发现这 2 个突变位点均为“致病性”位点; 采用 Clustalx 软件分析基因序列保守性, 结果显示, 这 2 个突变位点的基因序列在人、豚尾猴和褐家鼠等脊椎动物上高度保守, 提示这 2 个突变位点可能具有重要的功能意义。

RT-qPCR 和 Western blotting 实验结果表明, *ARHGEF16* (c.C236T 和 c.G619C) mRNA 和蛋白的表达量较野生型均有上调, 说明这 2 个位点的突变影响了 *ARHGEF16* mRNA 及蛋白表达。另外, 本研究通过 Cytoscape 在线分析, 发现 *ARHGEF16* 与 *RAC1* 存在直接关联。

*ARHGEF16* 编码的蛋白质功能尚不明确, 研究人员认为它与蛋白质-蛋白质和蛋白质-脂质相互作用有关<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[18]</sup>表明其参与人神经瘤胶质细胞的增殖和迁移、

斑马鱼视神经的再生。*RAC1* 基因编码的蛋白是一种 GTP 酶, 属于小 GTP 结合蛋白的 Ras 超家族。这个超家族的成员调节细胞内重要生物学功能, 包括细胞生长、细胞骨架重组和蛋白激酶的激活<sup>[19]</sup>。有研究<sup>[20]</sup>提出, *RAC1* 作为血管新生的重要因子, 在肿瘤的血管生成、心脑血管的稳态等方面发挥重要的作用。Lee 等<sup>[7]</sup>提出, *RAC1* 作为 *ARHGEF16* 下游靶基因在促进凋亡细胞的清除方面发挥重要作用。在吞噬细胞中过表达 *ARHGEF16* 促进了吞噬细胞吞噬凋亡细胞, 而在这个过程中, *ARHGEF16* 可通过 RhoG-Elmo-Dock4 途径激活 *RAC1*。

*ARHGEF16* 是否可以通过 *RAC1* 影响 TAPVC 等先天性心血管疾病的发生呢? RT-qPCR 结果显示在 293T 细胞中, *ARHGEF16* 过表达会上调 *RAC1* 的表达量。然而在心血管发育方面, *ARHGEF16* 对 *RAC1* 的具体调控作用需要更多功能实验进行验证。

综上所述, 本研究发现错义突变 c.C236>T (p.A79V)、c.G619>C (p.G207R) 影响 *ARHGEF16* mRNA 和蛋白的表达量; 并且 *ARHGEF16* 对 *RAC1* 表达量的调节, 可能会影响心血管发育的异常, 进而影响 TAPVC 的发生。其具体的机制有待进一步研究。本研究可为 TAPVC 的诊断、治疗与提前干预提供理论指导。

## 参 考 文 献

- [1] van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(21): 2241-2247.
- [2] Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, et al. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty[J]. Circ Res, 2013, 112(4): 707-720.
- [3] Karamlou T, Gurofsky R, Al Sukhni E, et al. Factors associated with mortality and reoperation in 377 children with total anomalous pulmonary venous connection[J]. Circulation, 2007, 115(12): 1591-1598.
- [4] Shi G, Zhu Z, Chen J, et al. Total anomalous pulmonary venous connection: the current management strategies in a pediatric cohort of 768 patients[J]. Circulation, 2017, 135(1): 48-58.
- [5] Nash D, Arrington CB, Kennedy BJ, et al. Shared segment analysis and next-generation sequencing implicates the retinoic acid signaling pathway in total anomalous pulmonary venous return (TAPVR)[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0131514.
- [6] Li J, Yang S, Pu Z, et al. Whole-exome sequencing identifies SGCD and ACVRL1 mutations associated with total anomalous pulmonary venous return (TAPVR) in Chinese population[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 27812-27819.
- [7] Lee J, Park B, Kim G, et al. Arhgef16, a novel Elmo1 binding partner, promotes clearance of apoptotic cells via RhoG-dependent Rac1 activation[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(11): 2438-2447.
- [8] Oliver AW, He X, Borthwick K, et al. The HPV16 E6 binding protein Tip-1 interacts with ARHGEF16, which activates Cdc42[J]. Br J Cancer, 2011, 104(2): 324-331.
- [9] Shi X, Huang T, Wang J, et al. Next-generation sequencing identifies novel genes with rare variants in total anomalous pulmonary venous connection[J]. EBioMedicine, 2018, 38: 217-227.
- [10] Huang D, Wang Y, Xu L, et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 247.
- [11] Bonazzi VF, Irwin D, Hayward NK. Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(1): 10-21.
- [12] Neill CA, Ferencz C, Sabiston DC, et al. The familial occurrence of hypoplastic right lung with systemic arterial supply and venous drainage "scimitar syndrome"[J]. Bull Johns Hopkins Hosp, 1960, 107: 1-21.
- [13] Bleyl S, Nelson L, Odelberg SJ, et al. A gene for familial total anomalous pulmonary venous return maps to chromosome 4p13-q12[J]. Am J Hum Genet, 1995, 56(2): 408-415.
- [14] Bleyl SB, Botto LD, Carey JC, et al. Analysis of a Scottish founder effect narrows the TAPVR-1 gene interval to chromosome 4q12[J]. Am J Med Genet A, 2006, 140(21): 2368-2373.
- [15] Bleyl SB, Saijoh Y, Bax NA, et al. Dysregulation of the PDGFRA gene causes inflow tract anomalies including TAPVR: integrating evidence from human genetics and model organisms[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(7): 1286-1301.
- [16] Zhong L, Chiusa M, Cadar AG, et al. Targeted inhibition of ANKRD1 disrupts sarcomeric ERK-GATA4 signal transduction and abrogates phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2015, 106(2): 261-271.
- [17] Degenhardt K, Singh MK, Aghajanian H, et al. Semaphorin 3d signaling defects are associated with anomalous pulmonary venous connections[J]. Nat Med, 2013, 19(6): 760-765.
- [18] Matsukawa T, Morita K, Omizu S, et al. Mechanisms of RhoA inactivation and CDC42 and Rac1 activation during zebrafish optic nerve regeneration[J]. Neurochem Int, 2018, 112: 71-80.
- [19] Wu W, Du S, Shi W, et al. Inhibition of Rac1-dependent forgetting alleviates memory deficits in animal models of Alzheimer's disease[J]. Protein Cell, 2019, 10(10): 745-759.
- [20] Flentje A, Kalsi R, Monahan TS. Small GTPases and their role in vascular disease[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): 917.

[收稿日期] 2019-08-05

[本文编辑] 吴 洋

