

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.04.005
文章编号: 1005-8982(2020)04-0029-05

临床研究·论著

TBX5 基因靶序列单核苷酸多态性与先天性心脏病的关系*

刘雪贞, 孙强, 纪龙, 刘华民, 张倩倩, 冯霞, 杨伟丽, 李栋
[山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东 泰安 271016]

摘要:目的 探讨 TBX5 基因 3' 非翻译区靶序列 SNPs 与先天性心脏病(CHD)遗传易感性的关系, 为 CHD 的分子机制研究提供线索。**方法** 利用 HaploView 软件筛选 TBX5 基因 3' 非翻译区功能性单核苷酸多态性(SNP), 并应用高分辨率熔解曲线检测 TBX5 基因 3' 非翻译区 SNP。采用病例对照研究分析 SNP 位点与 CHD 的关联。**结果** HaploView 软件筛选出 TBX5 基因 3' 非翻译区有意义的标签 SNP rs883079, 高分辨率熔解曲线法成功检测该 SNP 位点(rs883079)的 G/G、G/A 及 A/A 3 种基因型。TBX5 基因 rs883079(G>A) 位点等位基因或基因型分布频率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 CHD 易感性关联, A 是 CHD 的危险等位基因, A/A 为 CHD 的危险基因型($P < 0.05$)。**结论** TBX5 基因 rs883079 位点 SNP 与 CHD 有关系, rs883079(G>A) 携带突变纯合子基因型 A/A 个体患 CHD 的危险性升高。

关键词: 先天性心脏病/心脏病; TBX5 基因/基因; 多态性, 单核苷酸

中图分类号: R394.3

文献标识码: A

Association between single nucleotide polymorphism of TBX5 gene target sequence and congenital heart disease*

Xue-zhen Liu, Qiang Sun, Long Ji, Hua-min Liu, Qian-qian Zhang, Xia Feng, Wei-li Yang, Dong Li
(Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences,
Taian, Shandong 271016, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between SNPs in the 3' untranslated region of TBX5 gene and genetic susceptibility to congenital heart disease (CHD), and to provide clues for the study of the molecular mechanisms of CHD. **Methods** The functional SNPs of 3' untranslated region of TBX5 gene were screened by HaploView software, and genotypes of the SNP locus were detected by high resolution melting curve. A case-control study was used to analyze the association between SNP loci and congenital heart disease. **Results** HaploView software screened a significant SNP locus rs883079 in the 3' untranslated region of TBX5 gene. The high-resolution melting curve method successfully detected the SNP locus (rs883079) with G/G, G/A and A/A genotypes. There was a statistically significant difference in the allele or genotype distribution of rs883079 G>A locus between the case group and the control group ($P < 0.05$). Allele A was the risk allele of congenital heart disease. Genotype A/A was the risk genotype of congenital heart disease ($P < 0.05$). **Conclusions** TBX5 gene rs883079 locus SNP was associated with congenital heart disease, and individuals carrying the mutation homozygous genotype A/A had an increased risk of congenital heart disease.

Keywords: congenital heart disease; TBX5 gene; polymorphism, single nucleotide

收稿日期: 2019-08-16

* 基金项目: 山东省自然科学基金 (No.: ZR2017MH007)

[通信作者] 李栋, E-mail: tsmcdongli@163.com; Tel: 05386238116

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 作为病因未明的多基因遗传病, 发病率逐年上升, 给家庭与社会带来巨大的经济负担^[1-4]。*TBX5* 属于 *T-box* 基因家族一员^[5-7], 与心脏正常发育有关^[8-9]。研究表明, 基因 3' 非翻译区受 microRNA (miRNA) 靶向调控, miRNAs 靶序列单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 可通过影响靶基因表达水平进而影响个体对疾病的易感性。但关于 *TBX5* 3' 非翻译区 SNP 与 CHD 的相关性研究尚不多见。本研究对 *TBX5* 3' 非翻译区 SNP 与 CHD 易感性的关系进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 12 月—2015 年 5 月在山东大学齐鲁儿童医院就诊的 186 例部分单纯 CHD 患儿 (病例组)。所有病例经临床诊断、心脏彩超诊断、X 射线或 CT 影像检查 (优先考虑前两个诊断), 且排除心血管之外的畸形和无家族遗传史的非综合征 CHD 患儿。所有对照为本院同期儿童保健科就诊的 200 例健康体检儿童 (对照组), 均排除遗传性疾病。

1.2 方法

1.2.1 标签 SNP 的选取 ①获取 *TBX5* 基因及区域内的 SNP 信息: 首先从 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 获取人类 *TBX5* 基因的染色体位置及序列信息, 之后从 HapMap 数据库 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) 选择 Project Data HapMap Genome Browser release #28 (phases 1, 2 & 3-merged genotypes & frequencies) 获得中国北京汉族人中 *TBX5* 基因 SNP 位点的基因型数据; ②将获得的北京汉族人群中 *TBX5* 基因所有 SNP 位点基因型数据分别导入 Haploview 4.2, 找出最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) $\geq 5\%$ 的常见 SNP, 计算各个基因内 SNP 位点间的连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 程度数据 (r^2 值), 根据 r^2 值大小构建 Block 图谱并筛选具有代表性的标签 SNP 位点; ③标签 SNP 选择: 根据列出每个单倍域内 $r^2 \geq 0.8$ 的 SNP, 然后选出与 Block 内其余 SNP 之间 $r^2 \geq 0.8$ 个数最多, 且 r^2 平均值最大一个位于 3' 非翻译区的 SNP 作为标签 SNP, 如若同时有多个 SNP 符合条件, 则结合本次研究目的优先考虑 3' 非翻译区的标签 SNP。

1.2.2 *TBX5* 基因 3'UTR qPCR-HRM 扩增 提取研究对象外周静脉血基因组 DNA, 通过查询 NCBI

GenBank 获得 *TBX5* 基因 3' 非翻译区原始序列, 并以此为基础, 利用在线 Primer 5.0 软件设计高分辨率熔解曲线所需引物, 在 LightCycler® 96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司) 上进行扩增。反应体系总体积 $10\mu\text{l}$: 基因组 DNA $1\mu\text{l}$, Mg^{2+} $1.6\mu\text{l}$, 高分辨率熔解曲线 (high resolution melting analysis, HRM) Master Mix $10\mu\text{l}$, 正、反向引物各 $1\mu\text{l}$, 双蒸水 $5.4\mu\text{l}$ 。反应条件: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 65°C 退火 15 s, 60°C 延伸 15 s, 45 个循环。HRM 分析: 95°C 预变性 1 min, 40°C 变性 1 min, 65°C 退火 1 s, $65^\circ\text{C} \sim 97^\circ\text{C}$ ($0.07^\circ\text{C}/\text{s}$), 37°C 冷却 30 s。反应结束后, 通过 LightCycler® 96 软件中的 High Resolution Melting 模块对结果进行分析, 基因分型。

1.2.3 PCR 产物测序 随机选取利用 HRM 成功分型的 *TBX5* 基因 rs883079 位点 3 个基因型 G/G、G/A 及 A/A 各 10 个样本, 应用 Sanger 双脱氧链终止法进行测序, 测序结果与 HRM 分型结果进行比对。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验, 计算基因各个多态性位点的基因型频率和等位基因频率; 运用 Hardy-Weinberg 平衡在线检测程序检验研究样本是否具有群体代表性; 比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% CI 以非条件 Logistic 回归分析计算, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组性别、年龄比较

两组性别、年龄比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 标签 SNP 筛选

根据基因内 SNP 之间连锁不平衡程度, 采用 HaploView 软件构建 *TBX5* 基因 SNP 间的 Block 图。HaploView 软件运行结果显示, *TBX5* 基因内共构成 5 个 Block, 且结果只有 SNP rs883079 符合预设筛选 3' 非翻译区标签 SNP 条件。见图 1。

2.3 *TBX5* 等位基因分型结果

以经过测序的野生型 DNA 样品作为标准品, HRM 分析检测 *TBX5* 基因目的片段。选取 HRM 3 种分型样品进行测序验证, 测序峰图证实 *TBX5* 基因 3' 非翻译区 rs883079 位点存在 3 种基因型, 且与 HRM

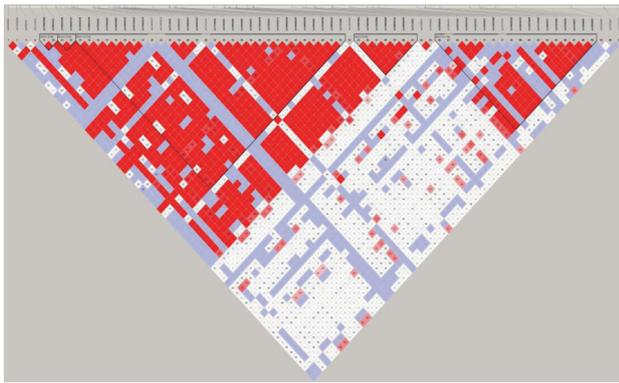
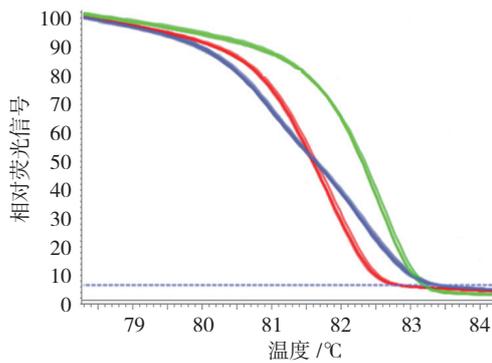


图 1 *TBX5* 基因构建 Block

结果一致。见图 2、3。

2.4 *TBX5* 基因多态位点各基因型分布 Hardy-Weinberg 平衡检测比较

TBX5 基因多态位点各基因型分布 Hardy-



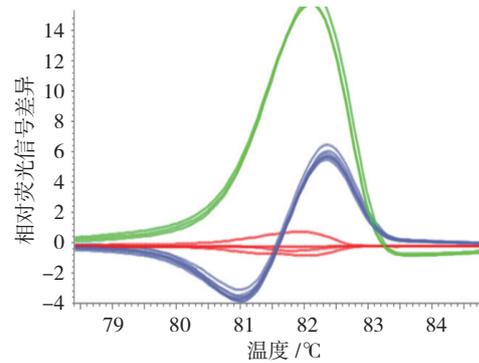
Weinberg 平衡检测比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.378, P=0.539$)。 *TBX5* 基因 rs883079 (G>A) 基因型在对照组中分布符合 Hardy-Weinberg 平衡, 可认为对照组人群来自总体人群, 不存在选择性偏倚, 具有群体代表性。见表 1。

2.5 两组 *TBX5* 等位基因频率分布比较

两组 *TBX5* 等位基因频率分布比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。突变等位基因 A 为 CHD 的危险性基因 ($P<0.05$); 携带 A/A 基因型的个体相对于携带 G/G 基因型者患 CHD 的危险性增加, 提示 A/A 可能为 CHDs 的危险基因型。见表 2。

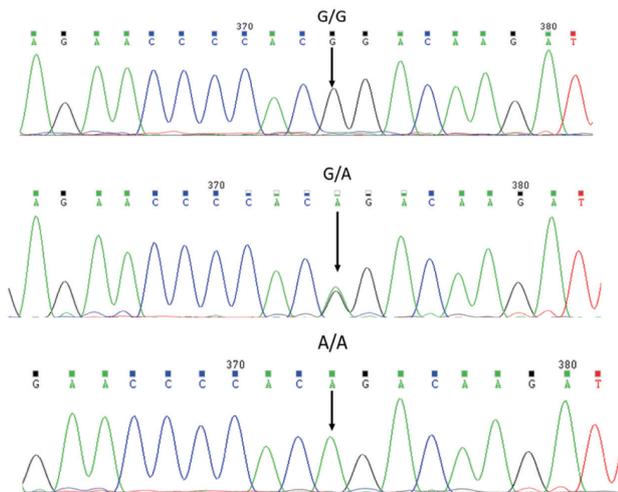
2.6 *TBX5* 基因多态性与不同类型 CHD 的关系

按照 CHD 具体表型分层, 对 *TBX5* 基因标签 SNP rs883079 进行分析发现, 尽管 rs883079 突变纯合子 A/



A: *TBX5* 基因 3 种基因型溶解曲线图; B: *TBX5* 基因 3 种基因型差异图。绿色为野生型 (G/G), 蓝色为突变杂合型 (G/A), 红色为突变纯合型 (A/A)。

图 2 qPCR-HRM 基因分型



A: 野生基因型 G/G; B: 杂合基因型 G/A; C: 纯和突变基因型 A/A。

图 3 *TBX5* 基因 rs883079 位点 3 种基因型测序图

表 1 *TBX5* 基因多态位点各基因型分布 Hardy-Weinberg 平衡检测比较 %

基因型	预测值	观察值
G/G	33.06	32.00
G/A	48.88	51.00
A/A	18.06	17.00

A 基因型与 CHD 易感性相关, 但其风险程度在不同类型的 CHD 中仍有差异。 *TBX5* 基因 rs883079 (G>A) 位点中, 以携带 G/G 野生纯合子基因型者为对照, 携带突变纯合子基因型 A/A 的个体间隔缺损的危险性升高。对于室间隔缺损患儿, 以携带 G/G 野生纯合子基因型者为对照, *TBX5* 基因 rs883079 多态, G/A 基因型、A/A 基因型或是 G/A+A/A 基因型均未见该位点

与室间隔缺损有统计学关联。对于房间隔缺损患儿，以携带 G/G 野生纯合子基因型者为对照，*TBX5* 基因 rs883079 多态无论是 A/A 基因型或是 G/A+A/A 基因

型都与 CHD 风险相关 ($P < 0.05$)。提示 *TBX5* 的该非编码区多态主要与 CHD 房间隔缺损相关，或是其危险因素。见表 3。

表 2 SNP 位点等位基因和基因型在病例组和对照组中的分布

基因型	对照组	病例组	\hat{OR}	95% CI		χ^2 值	P 值
				下限	上限		
G	230 (57.50)	185 (49.73)	1.000	-	-	4.680	0.031
A	170 (42.50)	187 (50.27)	1.368	1.030	1.817		
G/G	64 (32.00)	52 (27.96)	1.000	-	-	4.470	0.035
G/A	102 (51.00)	81 (43.55)	0.977	0.612	1.561		
A/A	34 (17.00)	53 (28.49)	1.919	1.090	3.376		
G/A+A/A	136 (68.00)	134 (72.04)	1.213	0.783	1.877		

表 3 *TBX5* 基因多态性与不同类型 CHD 的关系

基因型	对照组		病例组		\hat{OR}	95% CI		P 值
	频数	频率 /%	频数	频率 /%		下限	上限	
间隔缺损								
G/G	64	32.00	32	23.02	1.000	-	-	-
G/A	102	51.00	74	53.23	1.451	0.863	2.439	0.159
A/A	34	17.00	33	23.74	1.941	1.024	3.681	0.041
G/A+A/A	136	68.00	107	76.97	1.574	0.960	2.579	0.071
室间隔缺损								
G/G	64	32.00	23	26.43	1.000	-	-	-
G/A	102	51.00	46	52.87	1.255	0.696	2.264	0.451
A/A	34	17.00	18	20.68	1.473	0.700	3.100	0.306
G/A+A/A	136	68.00	64	73.56	1.309	0.747	2.296	0.346
房间隔缺损								
G/G	64	32.00	9	17.30	1.000	-	-	-
G/A	102	51.00	28	53.84	1.952	0.865	4.403	0.103
A/A	34	17.00	15	28.84	3.137	1.244	7.913	0.013
G/A+A/A	136	68.00	43	82.69	2.248	1.033	4.892	0.037

3 讨论

随着分子遗传学的发展，CHD 遗传因素的作用受到了越来越多的重视。心脏发育相关的转录因子在 CHD 发病机制中的重要作用已在一些生物模式中得到了证实。与心脏发育密切相关的转录因子异常可导致严重的 CHD。*TBX5* 是心脏早期发育过程中极为重要的转录因子之一，能通过与其他 2 个转录因子 *GATA4*、*NKX2-5* 在基因和蛋白水平上相互作用，调节心室特化、房室分隔等一系列心脏发育过程^[10]。

SNP 与疾病易感性的研究已广泛报道^[11]。CHD

与 SNP 遗传多态性的研究是近年来 CHD 病因研究的热点与重点之一。已有研究发现，一些位于 *TBX5* 基因 SNP 同心脏相关疾病有关。LIU 等^[12]对 192 例中国汉族室间隔缺损患儿研究结果显示，在 *TBX5* 基因找到与室间隔缺损易感 SNP (rs11067075)。SINNER 等^[13]对心房颤动患者研究发现，*TBX5* 基因 rs10507248 多态与心房颤动有关。王凤等^[14-15]对室间隔缺损患儿和健康对照的 *TBX5* 基因 3' 非翻译区相关 SNP 进行基因分型和关联分析，结果显示 *TBX5* 基因 3' 非翻译区 rs6489956 (C>T) 多态位点可增加室间隔缺损的

发病风险,功能研究发现 T 等位基因能增强 miR-9 和 miR-30a 的负向调控,导致 *TBX5* 基因的表达差异。

本研究测序验证发现,与 HRM 结果一致。笔者基于病例对照研究设计,依据基因分型结果探讨 rs6489956 (C>T) 位点 SNP 与 CHD 的关联,该位点基因型在两组分布比较有差异。笔者依据 CHD 的具体表型进行分层分析,发现对于房间隔缺损患儿,*TBX5* 基因 rs883079 多态性 A/A 基因型或是 G/A+A/A 基因型相对于 G/G 野生纯合子基因型者有增加 CHD 发病的风险,未发现该位点多态性与室间隔缺损之间的关联,猜测 *TBX5* rs883079 位点 SNP 可能是 CHD 房间隔缺损的危险因素。

有证据显示,*TBX5* 基因 rs883079 位点与心脏生理活动有关。一项 GWAS 研究发现,该位点与 QRS 时限和心室传导有关^[16]。PAZOKI 等^[17]在心室颤动的一项研究中也表明该位点与心电图 QRS 时限相关。POLYMI RTS 数据库预测当多态性位点 rs883079 等位基因为 G 时,只有 hsa-miR-132-5p 可能靶向结合该区域,当等位基因为 A 时,包括 hsa-miR-1231 在内的 11 个 miRNA 可能靶向结合^[18-19]。因此,当 rs883079 位点等位基因发生改变时,可能会影响这些 miRNA 的靶向调控,引起 *TBX5* 基因在翻译水平的改变,从而影响心脏发育,导致 CHD 的发生。有关 *TBX5* 基因 rs883079 位点 SNP 与 CHD,特别是室间隔缺损关系的分子机制还有待进一步行分子实验来验证。

参 考 文 献:

- [1] 闫景彬,闫秀梅,杨建享,等.产前超声筛查胎儿先天性心脏病的临床意义及高危因素分析[J].中华全科医学,2016,14(1): 114-115.
- [2] 孙驰,施帅,李京秀,等.先天性心脏病的基因遗传学及环境的影响[J].医学综述,2018,24(2): 248-253.
- [3] 邓木兰,梁巧容,陈寄梅,等.简单先天性心脏病患者疾病经济负担影响因素分析[J].岭南心血管病杂志,2018,24(2): 210-216.
- [4] 徐效龙,祁国荣,路霖,等.我国高原地区先天性心脏病影响因素的病例对照研究[J].中国预防医学杂志,2018,19(1): 1-4.
- [5] 谭赛男,孟凡琦,伍源,等.*TBX5* 基因多态性与单纯性先天性心脏病易感性的关联分析[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(11): 109-110.
- [6] 黄雄,仇小强,曾小云,等.Nkx2.5、GATA4 和 *TBX5* 基因多态性与广西壮族,汉族儿童室间隔缺损的关系研究[J].中国妇幼保健,2016,31(12): 2508-2513.
- [7] 杜佳,易岂建.NKX2-5, *TBX5*, GATA4 基因与先天性心脏病关系研究进展[J].儿科药学杂志,2018,24(5): 58-61.
- [8] WANG F, LIU D, ZHANG R R, et al. A *TBX5* 3'UTR variant increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population[J]. Cell Discov, 2017, 3: 17026.
- [9] KHATAMI M, HEIDARI M M, KAZEMINASAB F, et al. Identification of a novel non-sense mutation in *TBX5* gene in pediatric patients with congenital heart defects[J]. J Cardiovasc Thorac Res, 2018, 10(1): 41-45.
- [10] LUNA-ZURITA L, STIRNIMANN C U, GLATT S, et al. Complex interdependence regulates heterotypic transcription factor distribution and coordinates cardiogenesis[J]. Cell, 2016, 164(5): 999-1014.
- [11] 徐丽,谭榜究,李华.表面活性蛋白 D 基因多态性与肺部疾病易感性的研究进展[J].现代预防医学,2018,45(11): 2043-2046.
- [12] LIU C X, SHEN A D, LI X F, et al. Association of *TBX5* gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(1): 30-34.
- [13] SINNER M F, TUCKER N R, LUNETTA K L, et al. Integrating genetic, transcriptional, and functional analyses to identify 5 novel genes for atrial fibrillation[J]. Circulation, 2014, 130(15): 1225-1235.
- [14] 王凤,桂永浩,王红艳,等.miRNAs 对 *TBX5* 3'UTR 遗传变异的调控差异在室间隔缺损中的作用[C]//中华医学会第十七次全国儿科学术大会论文汇编(上册).中华医学会,2012.
- [15] 王凤,桂永浩,王红艳,等.*TBX5* 3'UTR 多态与间隔缺损畸形的遗传易感性关联及机制研究[C]//江浙沪儿科学术年会暨浙江省医学会儿科学分会学术年会,儿内科学疾病诊治新进展国家级学习班.浙江省科学技术协会,2012.
- [16] SOTOODEHNIA N, ISAACS A, DE BAKKER P I, et al. Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction[J]. Nat Genet, 2010, 42(12): 1068-1076.
- [17] PAZOKI R, de JONG J S, MARSMAN R F, et al. SNPs identified as modulators of ECG traits in the general population do not markedly affect ECG traits during acute myocardial infarction nor ventricular fibrillation risk in this condition[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57216.
- [18] ZIEBARTH J D, BHATTACHARYA A, CHEN A, et al. PolymiRTS database 2.0: linking polymorphisms in microRNA target sites with human diseases and complex traits[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(Database issue): D216-D221.
- [19] BHATTACHARYA A, ZIEBARTH J D, CUI Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: D86-D91.

(唐勇 编辑)

本文引用格式:刘雪贞,孙强,纪龙,等.*TBX5* 基因靶序列单核苷酸多态性与先天性心脏病的关系[J].中国现代医学杂志,2020,30(4): 29-33.