

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.10.004

先心病专题

胰岛因子1基因2个SNP位点与儿童 先天性心脏病的相关性研究

穆世茵¹ 张宏艳^{2,3}

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市儿童医院, 天津 300074;
3. 泰达国际心血管病医院, 天津 300457)

[摘要] 目的 探讨天津地区汉族儿童胰岛因子1(Islet1, ISL1)基因2个单核苷酸多态性(SNP)位点 rs41268421、rs1017 与先天性心脏病(CHD)的相关性。方法 应用聚合酶链反应(PCR)和基因测序技术对35例CHD患儿和30名除外CHD儿童的rs41268421、rs1017位点进行检测,分别比较两个SNP位点基因型频率和等位基因频率在两组中的分布情况,并进行单体型分析。结果 SNP位点 rs41268421 存在GG、GT、TT 3种基因型,CHD组T等位基因频率及携带T等位基因的基因型(包括GT和TT)频率高于对照组($P<0.05$),携带T等位基因的儿童患CHD的危险是G等位基因的4.833倍;rs1017位点存在AA、AT、TT 3种基因型,CHD组T等位基因频率及携带T等位基因的基因型(包括AT和TT)频率高于对照组($P<0.05$),携带T等位基因的儿童患CHD的危险是A等位基因的4.491倍;2个SNPs位点得出4种单体型,以TT型儿童发生CHD的危险性最高($OR=7.813$)。结论 天津地区汉族儿童中ISL1基因单体型TT的出现很可能会增加CHD的患病风险。
[中国当代儿科杂志, 2013, 15(10): 822-826]

[关键词] 先天性心脏病; ISL1基因; 单核苷酸多态性; 单体型; 儿童

Association between two SNPs of ISL1 gene and congenital heart disease in children

MU Shi-Yin, ZHANG Hong-Yan. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300074, China (Zhang H-Y, Email: hongyanzhang@yahoo.com)

Abstract: Objective To investigate the association between 2 SNPs of ISL1 gene and congenital heart disease (CHD) in Tianjin Han children. **Methods** Polymerase chain reaction and DNA sequencing were used to detect 2 SNPs at rs41268421 and rs1017 sites of ISL1 gene, including 35 CHD cases and 30 non-CHD controls. Differences of genotype and allele frequencies of rs41268421 and rs1017 sites were compared, and haplotype analysis of the two sites was performed. **Results** Three genotypes (GG, GT and TT) were detected at ISL1 gene SNP rs41268421, and three genotypes (AA, AT and TT) were detected at SNP rs1017. At rs41268421, GT+TT genotypes and T allele frequencies in the CHD group were statistically higher than in the controls. The risk of CHD in children with T allele was significantly increased compared with children with G allele ($OR=4.833$). At rs1017, AT+TT genotypes and T allele frequencies in the CHD group were statistically higher than controls. The risk of CHD in children with T allele was greater compared with children with A allele ($OR=4.491$; $P<0.05$). Four kinds of haplotype were detected in the two SNPs sites and TT type increased the risk of CHD ($OR=7.813$). **Conclusions** Haplotype TT may increase the risk of CHD in Tianjin Han children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(10): 822-826]

Key words: Congenital heart disease; ISL1 gene; Single nucleotide polymorphism; Haplotype; Child

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)是一类严重危害婴幼儿健康的先天畸形,是最常见的出生缺陷之一,占有主要的先天性异常类疾病的近三分之一,是婴幼儿非感染性疾病中最主要

的死亡原因^[1-2]。CHD由环境因素和遗传因素共同作用引起,尤以后者重要,然而其发病机制尚未明了。对CHD分子遗传学机制的研究,不仅可为阐明CHD的发生机制并进行遗传学干预提供理论

[收稿日期] 2013-05-25; [修回日期] 2013-06-26

[作者简介] 穆世茵,女,硕士研究生。

[通信作者] 张宏艳,主任医师,教授。

依据,还将为其他先天畸形的研究提供科学的方法。

胰岛因子1(Islet1, ISL1), 又称胰岛素增强子结合蛋白1, 是一种多效转录因子, 在胚胎期通过影响细胞的增殖、分化和迁移功能, 在运动神经元的分化、心脏的发育和胰腺的形成中发挥着重要的作用^[3-5]。ISL1基因作为心脏前体细胞最早的标志物参与心脏的发育和形成, 其极微小的异常表达都有可能引起心脏发育的畸形^[5]。美国Stevens等^[6]最近对美国人ISL1基因进行了单核苷酸多态性(SNP)分析, 对ISL1基因内部和周围存在的30个SNPs进行了研究。他们比较了CHD患儿和健康儿童在每个多态性位点以及多态性位点组合的分布差异。在研究评估的30个SNPs中, Stevens等^[6]发现CHD与其中的8个SNPs显著相关, 其中尤其与rs41268421、rs1017这两个位点具有较高的相关性。因此, 本研究选取rs41268421、rs1017这两个位点进行探究, 旨在探讨ISL1基因多态性与天津地区汉族儿童CHD的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2011年12月至2012年12月在天津市儿童医院内科住院接受治疗的35名CHD儿童纳入本研究, 其中男孩18例, 女孩17例, 男女之比为1.06:1, 年龄7个月至3岁, 平均年龄 23 ± 6 个月。患儿均符合CHD的诊断标准, 具有典型的临床症状, 并经心脏彩色超声、心导管或手术证实, 其中室间隔缺损类型患儿18例, 房间隔缺损类型患儿17例。来自我院同期外科收治的除外CHD的30名儿童作为对照组, 其中男孩15例, 女孩15例, 男女之比为1:1, 年龄6个月至3岁, 平均年龄 22 ± 9 个月, 经心脏彩色超声明确未患有CHD。全部研究对象均为汉族儿童, 相互之间无血缘关系, 籍贯均为天津。CHD组及对照组在年龄及性别上差异无统计学意义($P>0.05$), 两组具有可比性。本研究获得所有入选儿童家长或监护人知情同意及天津市儿童医院伦理委员会的批准。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集及基因组DNA提取 全部研究对象分别采集静脉血2 mL于肝素钠抗凝管中, 应用DNA提取试剂盒(PROMEGA #A7710, PROMEGA公司)提取DNA, 并将其溶解于TE缓冲液中, 置冰箱 -20°C 保存备用。

1.2.2 引物的设计与合成 根据GenBank中

ISL1基因序列以及参照相关文献^[6], 由上海生工生物技术有限公司合成引物。ISL1基因外显子6的扩增引物序列: 正向5' TCT AGT CCA TCC TAA TCT G 3', 反向5' AAA GTG GCA AGT CTT CCG AC 3', 产物片段大小为535 bp。

1.2.3 PCR反应扩增目的片段 PCR反应体系25 μL : $10 \times$ buffer 2.5 μL , dNTP (10 mM) 2.0 μL , Taq (5 U/ μL) 0.5 μL , 上下引物 (10 μM) 各0.5 μL , 基因组DNA 2.0 μL , 用去离子水补足至25 μL 。扩增条件: 95°C 预变性10 min, 以下30个循环(变性 95°C 30 s, 退火 56°C 30 s, 72°C 60 s), 最后 72°C 延伸10 min。取5 μL 的扩增产物用2%的琼脂糖凝胶电泳75 mV, 35 min, 电泳结束后于紫外成像仪上观察结果并记录。

1.2.4 PCR产物测序及序列分析 取535 bp处扩增条带阳性标本的PCR产物20 μL , 委托上海生工生物工程技术有限公司进行测序。应用Chromas软件分析所获测序结果。利用NCBI网站在线blast对所获序列进行对比分析。

1.3 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件进行数据处理与分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计数资料用例数(百分比)表示; 应用拟合优度 χ^2 检验计算Hardy-Weinberg平衡以判断样本的群体代表性; 基因型及等位基因频率采用 χ^2 检验; CHD与ISL1基因多态性的相关性通过计算优势比(OR)及其95%可信区间(95% CI)表示; 两个SNPs位点的单倍型分析采用SHEsis在线分析软件分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序结果

参照NCBI网站SNP位点rs41268421、rs1017, 利用该网站在线blast对所获序列进行对比分析发现, SNP位点rs41268421存在GG、GT、TT 3种基因型, rs1017存在AA、AT、TT 3种基因型, 如图1所示。测序所得结果: 在rs41268421位点, CHD组基因型GG 26例、GT 8例、TT 1例, 对照组基因型GG 28例、GT 2例、TT 0例; 在rs1017位点, CHD组基因型AA 20例、AT 13例、TT 2例, 对照组基因型AA 26例、AT 4例、TT 0例。

2.2 基因型及等位基因频率分布

在ISL1基因rs41268421、rs1017位点, CHD组和对照组基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡定律, 具有群代表性。在rs41268421位点,

CHD组携带T等位基因的基因型(包括GT和TT)频率及T等位基因频率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),携带T等位基因的儿童患CHD的风险是G等位基因的儿童4.833倍($OR=4.833$),见表1。在rs1017位点,CHD组携带T等位基因的基因型(包括AT和TT)频率及T等位基因频率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),携带T等位基因的儿童患CHD的危险是A等位基因儿童的4.491倍($OR=4.491$),见表2。

2.3 单体型分析

在rs41268421、rs1017两位点,以rs41268421基因型在前、rs1017基因型在后表示:CHD组GGAA型18例、GGAT型8例、GTAA型2例、GTAT型5例、GTTT型1例、TTTT型1例;对照组GGAA型25例、GGAT型3例、GTAA型1例、GTAT型1例。应用SHEsis在线软件对2个位点进行单体型分析,共检出4种单体型,得出表现TT单型型的儿童患CHD的危险度最高($OR=7.813$),见表3。

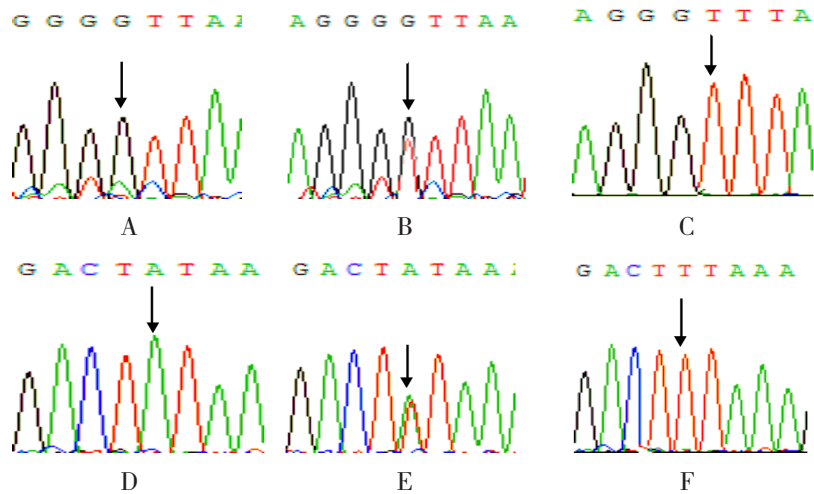


图1 ISL1基因SNPs位点rs41268421、rs1017测序图 上图为rs41268421位点,A:GG型,B:GT型,C:TT型;下图为rs1017位点,D:AA型,E:AT型,F:TT型。箭头所示为多态位点,绿色峰为碱基A,黑色峰为碱基G,同时单峰为纯合子基因型,套峰为杂合子基因型。

表1 CHD组与对照组rs41268421位点基因型频率与等位基因频率分布 [n(%)]

组别	n	基因型		等位基因	
		GG	GT+TT	G	T
对照组	30	28(93)	2(7)	58(97)	2(3)
CHD组	35	26(74)	9(26)	60(86)	10(14)
χ^2 值		4.169		4.625	
P值		0.041		0.032	
OR值				4.833	
95% CI				1.015~23.012	

表2 CHD组与对照组rs1017位点基因型频率与等位基因频率分布 [n(%)]

组别	n	基因型		等位基因	
		AA	AT+TT	A	T
对照组	30	26(87)	4(13)	56(93)	4(7)
CHD组	35	20(57)	15(43)	53(76)	17(24)
χ^2 值		6.807		7.405	
P值		0.009		0.007	
OR值				4.491	
95% CI				1.419~14.212	

表3 CHD组与对照组间单体型频率比较

组别	n	GA	GT	TA	TT
对照组	30	0.916	0.051	0.018	0.016
病例组	35	0.725	0.132	0.032	0.111
χ^2 值		7.728	2.484	0.274	4.132
P值		0.005	0.115	0.600	0.042
OR值		0.243	2.835	1.850	7.813
95% CI		0.085~0.694	0.741~10.851	0.179~19.116	1.285~47.500

3 讨论

心脏的发育是一个复杂的过程,胚胎期心血管系统发育过程中任何一个环节的异常都会导致先天畸形。ISL1 基因含有 6 个外显子(exon)和 5 个内含子(intron),定位于人类 5 号染色体 5q11.2,自首次从胰岛细胞的 cDNA 文库中发现 ISL1 基因到现在的 20 多年间^[7],多项研究已经证实 ISL1 在多种种属的不同组织中发挥着重要作用,已有研究发现 ISL1 基因的 SNP 与糖尿病和多种肿瘤疾病的发生发展相关^[8-9]。ISL1 基因其编码的蛋白质具有 3 部分高度保守的结构域: N 端含有两个串连的富含半胱氨酸和组氨酸的 LIM 结构域,介导与蛋白质间的相互作用; C 端含有一个表面有高密度碱性和极性氨基酸的同源结构域(homeodomain 结构域),与下游靶基因调控序列相结合,介导蛋白质与 DNA 之间的相互作用^[3]。近年来研究发现,ISL1 在心脏发育的最早期阶段起着关键性作用,其标记着心脏第二生心区(second heart field, SHF)的心脏前体细胞^[5],在心脏发育的胚胎早期,可以分化成心脏的起搏细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞^[10-11],并且对心房、心室及流入道交界处组织的发育有重要意义^[12]。ISL1 可协同 GATA4,激活心肌特异性基因 Nkx2.5、Mef2C 的表达,并受到 Wnt/ β -catenin 信号通路及 FGFs 信号分子的上调表达作用^[13-15],而且 ISL1 和 TBX-1 等心脏祖细胞标志基因受到 BMP4、BMP2 通路的负性调节^[16-17]。由此可见,ISL1 基因在心脏的发育中处于一个上游、核心枢纽的位置,对 ISL1 基因在 CHD 的发病机制中所扮演的角色进行研究显得十分必要。

Stevens 等^[6]最近对美国人 ISL1 基因进行了 SNPs 分析,发现 ISL1 基因多态性与 CHD 相关。本课题首次对 ISL1 基因外显子 6 内两个 SNP 位点 rs41268421 和 rs1017 多态性与天津地区汉族儿童 CHD 的相关性做了研究,并且首次将 rs41268421 和 rs1017 这两个位点联系起来进行分析。本研究在样本中检测到 rs41268421 和 rs1017 位点均存在多态性,这与 Stevens 等^[6]的报道一致。本研究着眼于天津地区汉族儿童,得出在 rs41268421 位点基因表型为 GT 和 TT 以及携带 T 等位基因及在 rs1017 位点基因表型为 AT 和 TT 以及携带 T 等位基因的儿童可能是 CHD 的易感人群。本研究通过对 2 个 SNP 位点进行单体型分析,得出表现 TT 单体型的儿童患 CHD 的危险度最高($OR=7.813$),也就是说这两位点同时表达突变型时,罹患 CHD

的风险最高。而至于这两个均位于 ISL1 基因的外显子 6 内,相距约 100 bp 的 SNP 位点之间究竟是怎样相互影响的,仍有待进一步的研究。

因此,通过检测 ISL1 基因多态性可能会筛查到 CHD 高危人群,在临床上为儿童 CHD 的早期发现与预防提供一条新的途径。rs41268421 和 rs1017 这两个位点的多态性是如何增加 CHD 的易感性呢?可能的原因是多态性影响了 ISL1 基因正常的转录、翻译,导致基因表达产物 mRNA 或蛋白质的异常,使 ISL1 基因丧失了正常的功能,导致标记 ISL1 的祖细胞表达异常,进而影响下游的 ISL1/Flk1 和 ISL1+/Nkx2.5+/Flk1- 细胞亚群,造成心脏的右心室以及大部分心房的心肌细胞,以及室间隔的发育异常。另外,ISL1 基因的点突变使得 ISL1-GATA-Mef2c 这一心脏发育的主要调控信号通路的异常,导致 ISL1 基因在第二生心区的表达下调,造成心脏发育的畸形,从而导致了 CHD 的易感性,然而确切的作用机制还有待今后更加深入的研究。

本研究为儿童 CHD 的研究提供了一条新的思路,但由于样本数量有限,并且只是选取了天津籍的汉族儿童,考虑到人群的种族、地区差异,ISL1 基因多态性与 CHD 的确切关系尚需要后续大样本、多中心的研究。

志谢:真诚地感谢在我们完成论文的过程中给予指导的各位老师和同学们,以及帮助我们收集样本及临床资料的天津市儿童医院心内科的医生们。

[参 考 文 献]

- [1] Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [2] 徐洁,杨中州,张姝,吴少亘,胡娅莉.先天性心脏病胎儿心脏及胎盘组织中 MAPK 及 Akt 信号通路分子的变化[J].中国当代儿科杂志,2010,12(5): 327-332.
- [3] Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM. Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation[J]. Cell, 1996, 84(2): 309-320.
- [4] Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, Evans SM, et al. Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas[J]. Diabetes, 2009, 58(9): 2059-2069.
- [5] Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, Nakano A, Chien KR. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages?[J]. Development, 2008, 135(2): 193-205.
- [6] Stevens KN, Hakonarson H, Kim CE, Doevendans PA, Koeleman BP, Mital S, et al. Common variation in ISL1 confers genetic susceptibility for human congenital heart disease[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10855.
- [7] Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of

- a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys His domain[J]. *Nature*, 1990, 344(6269): 879-882.
- [8] Barat-Houari M, Clement K, Vatin V, Dina C, Bonhomme G, Vasseur F, et al. Positional candidate gene analysis of Lim domain homeobox gene (*Isl-1*) on chromosome 5q11-q13 in a French morbidly obese population suggests indication for association with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1640-1643.
- [9] Barzelay A, Ben-Shoshan J, Entin-Meer M, Maysel-Auslender S, Afek A, Barshack I, et al. A potential role for *islet-1* in post-natal angiogenesis and vasculogenesis[J]. *Thromb Haemost*, 2010, 103(1): 188-197.
- [10] Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, et al. Multipotent embryonic *Isl1*⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification[J]. *Cell*, 2006, 127(6): 1151-1165.
- [11] Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart[J]. *Dev Cell*, 2003, 5(6): 877-889.
- [12] Nakano H, Williams E, Hoshijima M, Sasaki M, Minamisawa S, Chien KR, et al. Cardiac origin of smooth muscle cells in the inflow tract[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(2): 337-345.
- [13] Ille F, Atanasoski S, Falk S, Ittner LM, Marki D, Buchmann-Moller S, et al. Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord[J]. *Dev Biol*, 2007, 304(1): 394-408.
- [14] Park EJ, Ogden LA, Talbot A, Evans S, Cai CL, Black BL, et al. Required, tissue-specific roles for *Fgf8* in outflow tract formation and remodeling[J]. *Development*, 2006, 133(12): 2419-2433.
- [15] 俞立玮, 桂永浩. *Gata4* 转录后蛋白共价修饰[J]. 中国当代儿科杂志, 14(10): 800-803.
- [16] Liao J, Aggarwal VS, Nowotschin S, Bondarev A, Lipner S, Morrow BE. Identification of downstream genetic pathways of *Tbx1* in the second heart field[J]. *Dev Biol*, 2008, 316(2): 524-537.
- [17] Hu JG, Lu HZ, Wang YX, Bao MS, Zhao BM, Zhou JS. BMP signaling mediates astrocyte differentiation of oligodendrocyte progenitor cells[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 222(3): 195-200.

(本文编辑: 邓芳明)

· 消息 ·

2014年《中国当代儿科杂志》征订征稿启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊), 中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊, 北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 并被《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》全文收录, 最近本刊又通过了世界卫生组织西太平洋地区索引评审委员会的评审, 顺利进入了西太平洋地区索引(WPRIM)数据库。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重, 反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国外儿科研究、论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊, 每月15日出版, 向国内外公开发行人。从2014年开始本刊将全新改版, 版面编排、设计更加美观, 且全本杂志改为彩色印刷, 欢迎全国各高等医学院校, 各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位, 各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价20元, 全年240元。邮发代号: 国内42-188; 国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统, 免收审稿费。审稿周期4~6周。欲浏览本刊或投稿, 请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

为更好地与读者、作者进行沟通互动, 我刊于2012年2月入驻国内著名医学媒体丁香园博客, 网址: <http://i.dxy.cn/cjcp>。

联系地址: 湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部, 邮编: 410008

电话: 0731-84327402 传真: 0731-84327922 Email: ddek7402@163.com 网址: <http://www.cjcp.org>

中国当代儿科杂志编辑部

2013年8月26日