

TNNI3 基因 Arg186Gln 突变与家族性肥厚型心肌病的相关性分析*

陶琴¹ 何萍萍¹ 杨俊华² 杨吉猛¹ 方旭¹ 张郁青¹

[摘要] 目的:研究中国汉族人群家族性肥厚型心肌病(HCM)常见致病基因突变位点,并对基因型与临床表型关系进行分析。方法:利用靶向外显子捕获测序方法对9例家族性HCM家系先证者进行MYH7、MYBPC3、TNNT2及TNNI3基因全外显子扩增和高通量测序,使用Sanger测序法在家系内进行验证。对阳性结果患者进行家系调查研究,调查资料包括一般临床症状、心电图、超声心动图以及3.0T心脏磁共振。进行门诊或电话定期随访,随访时间为1年或至患者死亡。结果:在其中1个家系中发现TNNI3基因第8号外显子Arg186Gln突变,该突变使遗传密码发生G→A转变,从而使其所编码的186位氨基酸由精氨酸(Arg)变为谷氨酰胺(Gln)。该家系中除先证者外还存在2例HCM患者,先证者为体检时发现心电图异常前来就诊,无临床症状,其父时有胸闷,在研究调查过程中猝死,其祖母胸闷气促症状明显。健康对照组中未发现上述基因突变。结论:家族性HCM患者TNNI3基因突变位点为Arg186Gln,携带该突变基因型的HCM患者呈现的临床表型不同,具有明显的临床异质性。

[关键词] 肥厚型心肌病;TNNI3基因;Arg186Gln;突变

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.05.005

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

The correlation between Arg186Gln mutation of TNNI3 gene and familial hypertrophic cardiomyopathy

TAO Qin¹ HE Pingping¹ YANG Junhua²
YANG Jimeng¹ FANG Xu¹ ZHANG Yuqing¹

(¹Department of Cardiology, Jiangning Hospital of Nanjing, Nanjing, 211100, China; ²Department of Cardiology, The first Affiliated Hospital of Soochow University)

Corresponding author: ZHANG Yuqing, E-mail: tqsz07277@163.com

Abstract Objective: To research the TNNI3 gene's mutational site of familial hypertrophic cardiomyopathy (HCM) in Chinese Han population and to analyze the relationship between genotype and clinical phenotype. **Method:** Targeted exons capture sequencing method was used to sequence all exons extending and high through-put of TNNT2, MYBPC3, MYH7 and TNNI3 gene in 9 cases with familial HCM, and Sanger sequencing method was used to verify in family. Family research was conducted in those with positive result patients, data included general clinical symptoms, electrocardiogram, echocardiogram and 3.0T cardiac magnetic resonance were collected. Regular outpatient and phone follow-up lasted for 1 years or until death. **Result:** The Arg186Gln mutation of TNNI3 gene's exon 8 was identified in one family, the mutation caused the genetic code to change from G to A, which converted from arginine (Arg) to glutamine (Gln). Moreover, there were 2 HCM patients in the family excepted the propositus. The propositus had no clinical symptoms, and went to see a doctor because of abnormal electrocardiogram during physical examination, his father sometimes suffered chest distress and was sudden death during the research, while his grandmother suffered chest distress and shortness of breath, obviously. The aforementioned mutation was not found in health control group. **Conclusion:** The TNNI3 gene's mutational site of familial HCM is Arg186Gln, HCM patients who carried the mutant gene show different clinical phenotypes, the clinical heterogeneity is obvious.

Key words hypertrophic cardiomyopathy; TNNI3 gene; Arg186Gln; mutation

肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy,

HCM)是一种以心肌肥厚与室间隔不对称性肥厚为特征的常染色体显性遗传性心肌病,该病呈现出明显的家族聚集现象,一半以上的患者有家族史。HCM临床表现常为心律失常、运动耐量降低及猝死等,是导致青少年和运动员猝死的主要原

* 基金项目:江苏省卫计委科研项目(No:YG201501)

¹南京市江宁医院心内科

²苏州大学附属第一人民医院心内科

通信作者:张郁青, E-mail: tqsz07277@163.com

因^[1-2]。目前认为 HCM 是一种由编码肌收缩蛋白基因突变引起的疾病,患者心肌收缩能力受损,肌肥厚主要发生于心尖及室间隔,极易发生心律失常,并进一步诱发猝死^[3-5]。心肌肌钙蛋白用于调节心肌收缩功能,包括肌钙蛋白 I(cTnI)、肌钙蛋白 T(cTnT)以及肌钙蛋白 C(cTnT)3 种不同基因亚基。其中较常见的为 cTnI 与 cTnT。本研究在一家族性 HCM 家系中发现了 TNNI3 基因 Arg186Gln 突变,拟初步探讨该基因突变与临床表型的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

入选 2015-01—2016-12 南京市江宁医院心内科病区收治的 9 例无血缘关系的家族性 HCM 先证者。诊断依据为 2014 ESC 指南公布的 HCM 诊断标准:成人超声心动图检查显示并非完全因心脏负荷异常引起的左室心肌某节段或多个节段室壁厚度 ≥ 15 mm;对于 HCM 患者的一级亲属,超声心动图发现无其他已知原因的左室室壁某节段或多个节段厚度 ≥ 13 mm,即可确诊 HCM^[6]。对 9 例先证者进行 TNNI3 基因筛查分析,如发现异常突变基因,则对其家系成员进一步筛查。另选取 60 名健康志愿者为对照组,其年龄、性别及种族与研究家系相匹配。本研究经南京市江宁医院伦理委员会批准,所有调查对象均签署知情同意书。

1.2 一般临床资料收集

采集先证者和家系成员临床病史及家族史,收集心电图、二维多普勒超声心动图及心脏 MRI 检查资料。

1.3 研究方法

采用盐析法从外周血白细胞中提取 HCM 患者基因组 DNA。设计 TNNI3 基因第 8 号外显子引物,由北京六合华大基因科技有限公司合成。每个 PCR 扩增体系 30 μ l,反应体系含基因组 DNA 1 μ l,双向引物各 1 μ l,dNTP 2 μ l,10 \times buffer 3 μ l,DNA 模版 2 μ l,TaqDNA 聚合酶 0.2 μ l(Takara 合成)。H₂O 20.8 μ l。采用 BIO-RAD PTC-200 PCR 仪扩增条件及步骤:预变性 96 $^{\circ}$ C 5 min,变性 96 $^{\circ}$ C 20 s,退火 58 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;终末延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min,保存于 4 $^{\circ}$ C。采用 DYY-8C 电泳仪进行 PCR 扩增产物电泳检测(北京六一仪器厂)。PCR 产物纯化,采用 Applide Biosystems ABI370XL 型 DNA 测序仪分析结果。突变位点的确定:运用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/> 比对程序来分析测序结果,确定突变位点。对测序结果异常患者进行家系调查,进一步验证。

1.4 随访

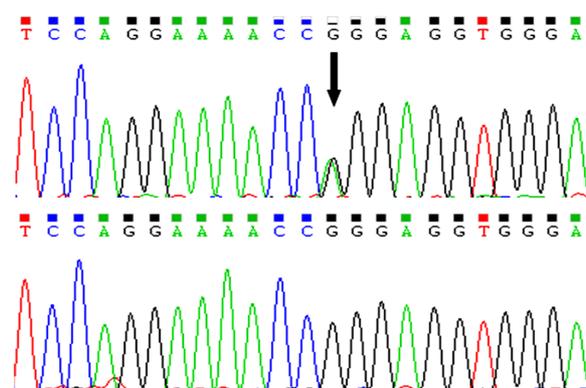
对先证者及其家系成员进行门诊或电话定期

随访,内容包括家系成员有无新发 HCM,有无死亡以及死亡原因。随访时间为 1 年或至患者死亡。

2 结果

2.1 基因测序结果

在 1 个中国汉族家族性 HCM 家系中发现 TNNI3 基因第 8 号外显子 Arg186Gln 突变,该突变使遗传密码发生 CGG \rightarrow CAG 转变,从而使其所编码的 186 位氨基酸由精氨酸(Arg)变为谷氨酰胺(Gln)。在对照组中未发现此突变。家系成员及对照组基因测序结果见图 1。



上图突变型,箭头处示突变位点;下图为正常型,箭头处示正常碱基 CC 纯合子。

图 1 基因测序结果

Figure 1 The result of gene sequencing

2.2 先证者家系图谱

携带该突变的家系图谱见图 2。先证者及其父亲、祖母为 HCM 患者,均发生 TNNI3 基因 Arg186Gln 突变,而其他家系成员检测结果为阴性。先证者(III-1)为 30 岁男性,2015 年 9 月因体检发现心电图异常于我院就诊,无临床症状;常规 12 导联心电图示窦性心律,V₂~V₆ 导联 ST 段异常,T 波倒置;二维超声心动图检查示 HCM 表现,室间隔厚度(IVST)约 21 mm,左心室后壁(LVP-WT)厚度约 9 mm,左心室舒张末期内径(LVDd)约 45 mm,左心室射血分数(LVEF)为 69%,无左室流出道梗阻;心脏 MRI 示室间隔心肌存在延迟强化。先证者父亲(II-2)2015 年 11 月确诊为 HCM,平时活动后存在胸闷症状;心电图示 V₂~V₅ 导联 ST 段异常且 T 波倒置,V₆ T 波低平,R 波递增不良;心脏彩超示 IVST 约 19 mm,LVPWT 厚度约 10 mm,LVDd 约 46 mm,LVEF 为 62%,无左室流出道梗阻;心脏 MRI 示室间隔心肌存在延迟强化;该患者 2016 年 5 月于家中猝死。先证者祖母(I-1)2003 年确诊为 HCM,胸闷气促症状明显,活动后加重,心电图示 V₃~V₆ 导联 ST 段异常且 T 波倒置;心脏彩超示 IVST 约 16 mm,LVP-WT 厚度约 9 mm,LVDd 约 41 mm,LVEF 为

58%,无左室流出道梗阻。先证者祖母因年龄较大,无法配合心脏 MRI 检查,故未查。该家系 HCM 成员均为非梗阻性 HCM,临床特点见图 3~5。

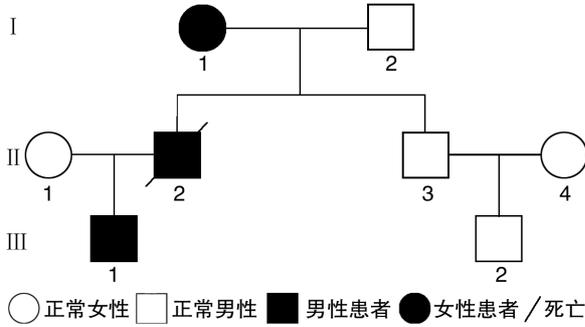
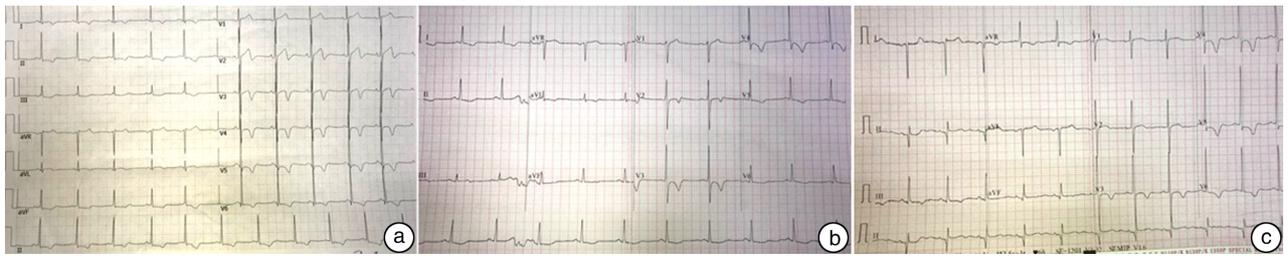


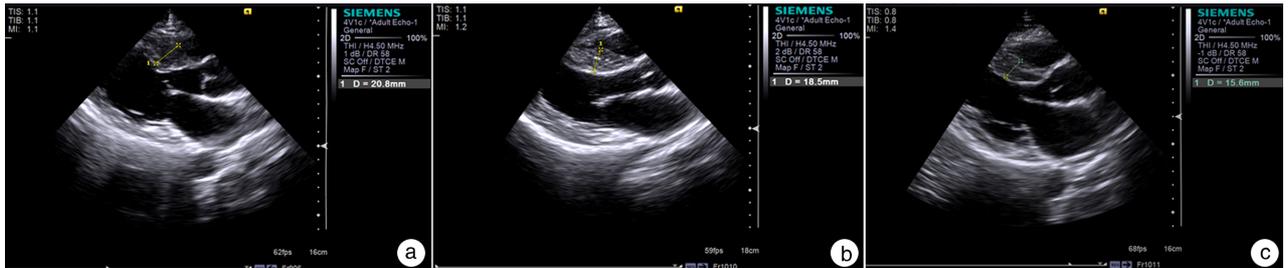
图 2 HCM 患者 TNNI3 基因 Arg186Gln 突变家系谱图
Figure 2 The family tree map of HCM



a:先证者;b:先证者父亲;c:先证者祖母。

图 3 心电图

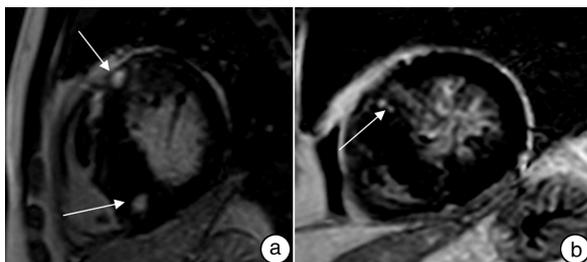
Figure 3 Electrocardiograms



a:先证者;b:先证者父亲;c:先证者祖母。

图 4 超声心动图

Figure 4 Echocardiograms



a:先证者;b:先证者父亲。

图 5 心脏 MRI 图

Figure 5 Images of heart MRI

2.3 随访结果

随访 1 年发现,该家系成员的临床症状轻重不一,先证者无临床症状,心电图无动态改变,复查超声心动图 IVST 较前未见明显进展,各心腔大小及心功能较前无明显改变;其父以猝死为主要临床特征;其祖母以胸闷气促为主要临床表现,因年龄大,行动不便,无法来院复查。

3 讨论

肌钙蛋白是细肌丝的构成蛋白之一,在调节肌肉的收缩与舒张功能过程中有重要作用。肌钙蛋白由肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T 及肌钙蛋白 C 组成。cTnI 是肌钙蛋白 I 的心脏异构体,其基因 TNNI3 位于染色体 19p13.2~q13.2 上,编码 210 个氨基酸,包含 8 个外显子,约 5% 的 HCM 是由这些突变所致,多数位于第 7、8 外显子,大部分为错义突变

或缺失突变^[7]。现已发现有 20 多个基因的 1 000 多种突变可导致 HCM^[8]。肥厚型心肌病的遗传情况和临床表现差别非常大,有些患者终身不发病,有些患者临床症状明显,甚至很快出现心力衰竭和猝死^[9]。

本研究发现 TNNI3 基因第 8 号外显子 Arg186Gln 突变,该突变具有 TNNI3 突变的一些共性,即不同患病者之间表型异质性大。在该家系中接受家系调查的 3 例携带 TNNI3 基因 Arg186Gln 突变的患者,全部发病,外显率 100%,年龄为 30~82 岁,临床症状有轻有重,先证者无临

床症状,其父以猝死为主要临床特征,其祖母以胸闷气促为主要临床表现。心脏彩超显示均以室间隔肥厚为主,心电图均存在 ST 段异常及 T 波倒置,先证者及其父心脏 MRI 存在延迟强化,其祖母未查。心脏 MRI 目前作为一种高分辨率、无创伤、无辐射的影像学手段,在对心肌纤维化的检测中占有重要地位^[10-11]。目前已有研究表明 MRI 所见心肌延迟强化可以代表 HCM 组织病理学上的心肌纤维化,是预测 HCM 患者心脏猝死与心力衰竭等心脏事件的重要指标^[12-13]。因此,心脏 MRI 对评价 HCM 患者的临床风险及预后具有较好的应用前景。

TNNI3 基因突变导致 HCM 的发生机制尚不明确,有研究认为可能是由于基因突变以后,产生了异常的肌钙蛋白 I,增加了其对心肌纤维的 Ca^{2+} 的敏感性,减弱了对肌球、肌动蛋白结合的抑制作用,突变部分的肌小节收缩力亢进,从而使心肌细胞的排列出现紊乱,最终诱发 HCM。根据组织病理学研究,HCM 患者的心肌呈现程度不同的纤维化,心肌细胞代偿性肥大,且心肌细胞存在不规则重新排布以及胶原纤维的增生变化^[13-14]。心肌纤维化可以导致心肌重构,与 HCM 患者发生心律失常、心力衰竭及心脏猝死有重要联系。

本研究对 9 个家系的 HCM 患者进行 TNNI3 基因筛查,发现 TNNI3 基因 Arg186Gln 突变,该突变基因的携带者外显率为 100%,患者发病年龄较早,以室间隔肥厚为主,临床症状轻重不一,病情相对不稳定。对于以室间隔肥厚为主的 HCM 家系有必要进行 TNNI3 的突变筛查。目前,随着我国学者针对 HCM 致病基因研究的深入化,发现的基因突变位点越来越多,这将有利于分析中国 HCM 患者的致病基因分布和表型特征,为 HCM 的诊断和预后起到关键的指导作用。

参考文献

- [1] 黄纬凌,杨俊. 肥厚型心肌病治疗新进展[J]. 临床心血管病杂志,2016,32(8):766-768.
- [2] Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, et al. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles[J]. JAMA, 1996, 276(3):199-204.
- [3] Van der Velden J, Ho CY, Tardiff JC, et al. Research priorities in sarcomeric cardiomyopathies[J]. Cardiovasc Res, 2015, 105(4):449-456.
- [4] 丁春丽. 肥厚型心肌病患者扩张相的特征与生存状况研究[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(2):133-136.
- [5] 赵新涛,吴亚杰,陈伊,等. β 肌球蛋白重链基因 Pro731Ser 突变与家族型肥厚型心肌病的相关性研究[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(7):571-576.
- [6] 张兆国. 关于肥厚型心肌病诊断和猝死防治建议(2014ESC 指南节选)[J]. 实用心电学杂志, 2016, 25(1):1-5.
- [7] Ho CY, Seidman CE. A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2016, 113(24):858-862.
- [8] Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy[J]. Lancet, 2014, 381:242-255.
- [9] 苟成,刘金秋. 肥厚型心肌病少见亚型:左心室中部梗阻性肥厚型心肌病[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(12):1263-1265.
- [10] 朱静,徐建. 心肌纤维化定量分析方法[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(11):1365-1368.
- [11] 王忠振,夏云龙,杨延宗. 心脏磁共振成像技术对心脏衰竭患者心肌纤维的评估及临床运用[J]. 心血管病学进展, 2013, 34(1):104-107.
- [12] Green JJ, Berger JS, Kramer CM, et al. Prognostic value of late gadolinium enhancement in clinical outcomes for hypertrophic cardiomyopathy[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2012, 5(4):370-377.
- [13] Rubinshtein R, Glockner JF, Ommen SR, et al. Characteristics and clinical significance of late gadolinium enhancement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circ Heart Fail, 2010, 3(1):51-58.
- [14] Moravshy G, Ofek E, Rakowski H, et al. Myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy accurate reflection of histopathological findings by CMR[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2013, 6(5):587-596.

(收稿日期:2017-10-27; 修回日期:2018-01-31)