

## 基因检测在肥厚型心肌病中的应用进展

尚依一<sup>1</sup> 刘罗<sup>1</sup> 庞明杰<sup>2</sup> 张艳<sup>3</sup>

(1.昆明理工大学医学院 昆明理工大学附属医院,云南 昆明 650032; 2.云南省第一人民医院心内科,云南 昆明 650032; 3.云南省第一人民医院磁共振影像科,云南 昆明 650032)

**【摘要】** 肥厚型心肌病(HCM)是常见的遗传性心血管疾病之一,发病隐匿,预后差异大,是青少年心源性猝死的主要原因。近年来随着 HCM 病理生理机制研究的深入及基因工程技术的发展,其治疗则向分子靶向药物及基因治疗方向转变。现分析 HCM 的致病突变基因,明确基因检测对于 HCM 的重要指导作用,归纳并总结近年来对于 HCM 的基因检测方法。

**【关键词】** 肥厚型心肌病;基因突变;检测方法

**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.06.009

## Gene Detection for Hypertrophic Cardiomyopathy

SHANG Yiyi<sup>1</sup>, LIU Luo<sup>1</sup>, PANG Mingjie<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>3</sup>

(1.Kunming University of Science and Technology School of Medicine, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, Yunnan, China; 2. Department of Cardiology, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan, China; 3. Department of Magnetic Resonance Imaging, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan, China)

**【Abstract】** Hypertrophic cardiomyopathy(HCM) is one of the common hereditary cardiovascular diseases, with hidden onset and large prognostic differences. It is the main cause of sudden cardiac death in adolescents. In recent years, with the in-depth study of the pathophysiological mechanism of HCM and the development of genetic engineering technology, its treatment has shifted to molecular targeted drugs and gene therapy. This article analyzes the pathogenic mutation genes of HCM, clarifies the important guiding role of genetic testing for HCM, and summarizes the genetic testing methods for HCM in recent years.

**【Key words】** Hypertrophic cardiomyopathy; Gene mutation; Detection method

肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)是一组以室间隔和/或左心室不对称性肥厚为主要特点的常见遗传性心肌病,是青少年心源性猝死的主要原因<sup>[1-2]</sup>。其发病机制尚未完全明确,临床表现及严重程度差异较大<sup>[3-4]</sup>,临床上多采取对症治疗,但治疗效果欠佳<sup>[5]</sup>,严重者会发生心力衰竭及猝死,危及生命。

近年来,对 HCM 病理生理学机制研究的不断深入,其治疗已向分子靶向药物和基因治疗方向转变<sup>[6]</sup>。HCM 的基因研究始于 30 年前,由于 HCM 患者的早期临床症状并不显著<sup>[7]</sup>,而基因检测可在临床疾病发病早期识别 HCM 患者,从而达到早期诊断、及时干预和判断预后的目的,因此,基因检测已成为欧洲和北美指南中 I 类推荐的检查<sup>[8-9]</sup>。

自 1990 年 Geisterfer-Lowrance 等<sup>[10]</sup>发现  $\beta$ -肌球蛋白重链基因( $\beta$ -myosin heavy chain gene, MYH7)以来,相继多个基因被标记为 HCM 致病基因<sup>[11]</sup>。尽管在随后的几年,基因检测取得了巨大的进展,但检测体系覆盖不全,仍有 40% 的患者存在除已发现基因外的其他突变,且这些突变数目较多,提示 HCM 仍有致病基因有待发现。此外,遗传变异的机制通路仍不十分清楚,尤其是一些较罕见的突变。

目前,检测基因突变的方法较多,例如:经典的限制性片段长度多态性、单链构象多态性、高分辨率溶解曲线分析、实时荧光 PCR 检测、毛细管电泳和高通量测序等,以上技术各有优缺点。Sanger 测序是目前所有基因检测的国际金标准,读取速度快,测序片段长,准确率高,但测序试剂昂贵,对于无明确突变基因的测

基金项目:云南省科技厅基础研究计划项目(2018FE001-116)

通信作者:庞明杰, E-mail: 1836443709@qq.com

序筛查难以完成;限制性片段长度多态性、单链构象多态性和高分辨率溶解曲线分析方法相对简单,但灵敏性和准确性差;毛细管电泳技术具备高效、快速等优点,但由于进样量少,因而制备能力差;高通量测序技术主要适用于大规模基因测序,但设备要求高,临床上难以普及;实时荧光 PCR 具有快速、简便和准确等特点,但耗材十分昂贵,且不能监测扩增产物的大小。现对 HCM 的基因突变常见检测手段作一归纳总结。

## 1 基因突变对 HCM 的影响

自 HCM 的第一个致病基因被发现以来,在过去的 30 年已发现了共 23 个相关致病基因<sup>[11]</sup>,其主要的发病机制包括心肌细胞钙循环及钙敏感性降低,导致心脏收缩及舒张功能障碍,肌原纤维收缩功能受损而导致的代偿性心肌肥厚以及心肌舒张功能障碍,心肌细胞纤维化增加和微血管功能障碍等,但这些致病机制的各个环节并不十分明确。HCM 绝大部分为常染色体显性遗传,由编码心脏肌小节蛋白基因的突变所致,其中有 4 个基因变异的频率较高。

### 1.1 心肌肌球蛋白结合蛋白 C3

1995 年,心肌肌球蛋白结合蛋白 C3 (cardiac myosin binding protein-C3, MYBPC3) 突变第一次被 Watkins 的研究团队<sup>[12]</sup>所报道,这也是被报道出的首个与家族遗传性 HCM 相关的基因,而经过后期实验研究证实,20%~25% 的 HCM 是由 MYBPC3 的突变引起。与 HCM 相关的 MYBPC3 突变 90% 以上含有提前终止密码子并编码截断的蛋白质<sup>[13]</sup>。MYBPC3 突变会使蛋白功能失调,从而引起心脏肌球蛋白 C 的亲合力降低,导致 C 端和肌球蛋白结合域受影响,无法固定肌小节结构,致使蛋白质被迅速降解,不能整合到肌丝中。

### 1.2 MYH7

MYH7 是肌球蛋白最重要的亚单位之一,约占肌球蛋白总量的 95%,位于染色体 14q12,1990 年,Geisterfer-Lowrance 等<sup>[10]</sup>发现该基因中 13 号外显子的一个错义突变会导致 HCM。MYH7 突变占 HCM 的 35%~50%,在该基因上已发现的近 200 个突变点位通过影响 MYH7 球状头端的三磷酸腺苷分解位点和肌动蛋白的结合位点,降低粗肌丝和细肌丝的亲合力,进而导致 HCM<sup>[14-15]</sup>。

### 1.3 心肌肌钙蛋白 T 基因

1994 年,Akhtar 等<sup>[16]</sup>发现另一个引起突变的基因:心肌肌钙蛋白 T 基因(TNNT2)。该基因占 HCM 患者的 5%~15%,且常显示出一个特定表型。研究表明,TNNT2 的致病突变大部分为错义突变,这种突变会导致左心室肥大伴随不同程度的心肌细胞纤维化<sup>[14,17]</sup>。虽然 TNNT2 突变所导致的 HCM 心肌肥厚

程度较轻,但发生心源性猝死的风险却很高,且预后都较差。

## 1.4 心肌肌钙蛋白 I 基因

心肌肌钙蛋白 I 基因(TNNI3)是肌钙蛋白复合物的抑制亚基,位于 19 号染色体 p1 区域,8 个外显子,可编码 210 个氨基酸<sup>[17]</sup>,其作用是抑制肌球蛋白三磷酸腺苷酶活性。该基因突变表现为混合型、形态学特征不明显的心肌病<sup>[14]</sup>。5%左右的 HCM 是由该基因突变所致。国外研究发现 TNNI3 的第 186 位氨基酸由精氨酸变为甘氨酸,这种改变表现出 HCM 和左心室非致密化不全的混合形态特征<sup>[14,18]</sup>。

## 2 基因检测类型

### 2.1 ACMG-AMP 指南与心肌病遗传评估

在基因检测中,由于人类基因组的复杂性及缺乏可靠的研究验证其功能和确定位点变异所导致的临床表现的原因,美国医学遗传学及基因组学学会(ACMG)和分子病理学协会(AMP)提出了解释遗传变异的最新指南<sup>[19]</sup>,其中包括分类的标准化,应纳入评估中的数据及该数据的相对大小,为变异解释提供了一个框架<sup>[20]</sup>。

心肌病的基因评估在心肌病确诊后进行,这其中就包含了基因检测,由于心肌病与 ACMG 列表中 27% 的基因相关,并且属于表型,与另一些疾病所表现出的临床症状相似,难以鉴别,所以在一定程度上,基因检测还为心肌病的鉴别诊断和治疗方法提供了重要指导<sup>[21]</sup>。

如前文所述,HCM 被认为是肌节病,编码肌节蛋白的基因变异是引起 HCM 的常见原因。其检测的诊断率为 30%~60%,在已知 HCM 家族史的个体检测发病率则更高<sup>[22]</sup>,并且还具有基因型状态的预后价值。

Robyns 等<sup>[23]</sup>在评估 HCM 的基因型和表型之间的关系时发现,对筛选的 3 个基因型:MYBPC3、MYH7 和 TNNT2 采用变性高压液相色谱检测后,对异常结果进行了 Sanger 测序,并在这个过程中严格采用 ACMG-AMP 标准,其在 37% 的患者中检测出了基因突变,并且发现绝大多数患者 MYBPC3 和 MYH7 以及肌钙蛋白复合物 TNNT2、TNNI3 存在突变;同时据其他研究表明,MYH7 和 MYBPC3 中的致病性变异约占所有可行性分子诊断病例的 80%<sup>[24]</sup>。除了肌节基因外,在 HCM 患者中核心筛选的基因还包括 GLA、PRKAG2 和 LAMP2<sup>[21]</sup>。

在 Robyns 等的试验中,部分患者确诊时较年轻,而病情却更加严重,包括心肌明显肥大和更加频繁的晕厥,但心源性猝死的发生率并没有因为不同的突变而显示较大差异,而是基本相似的<sup>[23]</sup>。

在随后的病例随访当中研究者们发现,与阴性突

变患者相比,阳性突变患者处于较高的风险当中,并且还有数据显示 MYBPC3 突变携带者的生存期较差,这与 Charron 等<sup>[25]</sup>提出的“与 MYBPC3 相比,MYH7 突变携带者的生存期较差”这一理论刚好相反,这或许是由于研究者样本中 MYBPC3 突变的携带者出现了更加严重的表型。但不可否认的是,MYH7 仍是 HCM、扩张型心肌病和限制型心肌病等几种心肌病的主要致病基因。因为它们有较高的合并患病率且对于患者健康有严重威胁,MYH7 依旧是临床实践中检测最常见的基因之一。

## 2.2 用目标外显子捕获技术和二代测序技术对 HCM 进行基因筛查

目前,二代测序是发展最快的测序技术,主要特点是通量大,测序速度快,可边测序边合成,几乎满足当前测序的全部需求,而外显子捕获技术是一种选择基因组编码序列的高效策略,对研究已知基因的单核苷酸多态性、插入缺失等基因组变异检测具有较大的优势,应用于罕见病、遗传代谢病的病因查找。

张智文等<sup>[26]</sup>通过对 1 个 HCM 家系目标区域测序发现, $\alpha$ -辅肌动蛋白是在心肌中唯一表达的肌肉亚型,而 ACTN2 基因是编码该亚型的基因之一。该基因的 c.1162T>A 突变后,会导致第 388 位由色氨酸转换成精氨酸,轻度或中度 HCM 与该种蛋白质的突变存在一定的相关性。该突变在 1000 Genomes 及 dbSNP 数据库中报道较少,为罕见变异,而同时为罕见变异的还有 MYBPC3 基因 c.472G>A 杂合突变。

MYBPC3 的免疫球蛋白样结构域 C2 是由其第 14 号外显子所编码的,而外显子后的一段序列所编码的纤维连接蛋白 III 型结构域包含了肌球蛋白及肌联蛋白的结合位点,若这其中的某段或某个序列发生了错义突变,那么该蛋白会被迅速降解,使得心肌肌球蛋白的结构和功能发生改变,无法像正常蛋白一样固定粗肌丝,进而影响肌小节的功能,而这种突变也会导致第 158 号的缬氨酸转换成甲硫氨酸,导致 HCM 的发生。这种变异所致的 HCM 一般会于中年后发病,发病时间晚,且心肌肥厚程度较轻,病程进展也较为缓慢。

研究人员还发现,在 TNNI3 中,也存在 c.235C>T 的突变,TNNI 是一种抑制亚基,由 TNNI3 基因所编码,有阻断肌动蛋白和肌球蛋白间相互作用,介导横纹肌松弛的作用,在 TNNI3 发生突变后蛋白第 79 号的精氨酸转换成半胱氨酸,使得横纹肌松弛,功能受损,介导 HCM 的发生。而研究人员在后续的研究中也发现,HCM 同时存在两个以上的基因突变是非常罕见的,且临床症状会更加严重。

这种检测方法有助于筛查家系突变基因,对 HCM 患者的治疗方案和其家系成员的早期诊断具有较高实

用价值,并且对突变携带者的早期干预和遗传咨询具有非常重要的临床意义。

## 2.3 HCM 致病基因热点突变位点 TaqMan-MGB 探针检测法

HCM 具有较强的临床遗传异质性,导致了携带有不同突变位点的 HCM 患者临床表型或发病时间存在差异,因此对 HCM 的预防尤为重要。随着遗传疾病基因突变检测方法的进步和发展<sup>[27-28]</sup>,以及在临床 HCM 诊断方面的推广与应用<sup>[29-30]</sup>,基因检测和家族筛查在临床早期诊断中发挥着越来越关键的指导作用<sup>[31-32]</sup>。

王玉鑫等<sup>[28]</sup>经过实验发现,TaqMan-MGB 探针技术具有淬灭效果好、探针短和结合稳固等优点,是检测基因突变的强有力工具。同时,TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 方法能在封闭的 PCR 管内快速、灵敏、准确地检测到单个碱基的突变,成本较低,且对仪器设备要求不高,对基因检测具有很好的推广作用<sup>[33-34]</sup>。

研究人员通过对 TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 引物探针扩增条件及引物探针灵敏性、特异性和重复性进行探索和优化,以阳性突变的 HCM 患者基因组为模板进行回复性验证,建立了 5 个与 HCM 发病相关的突变位点 (MYH7-c.1987C>T、TNNI3-c.370G>C、MYH7-c.2155C>T、TNNI3-c.433C>G 和 PRKAG2-c.298G>A) 的实时荧光 PCR 检测方法<sup>[28]</sup>。与传统的 TaqMan 不同的是:TaqMan-MGB 在其 3' 端连接了非荧光的淬灭基团 MGB,当探针序列与模板结合时,MGB 能高度结合于 DNA 双链的小沟,增加了寡核苷酸探针和单链模板结合的稳定性。同时,TaqMan-MGB 通过缩短探针序列长度,增加其特异性,实现了单碱基的区分能力<sup>[28]</sup>。当具有 5'-3' 外切酶活性的 DNA 聚合酶对碱基进行延伸时,可将发光基团解离下来,解除了非荧光淬灭基团对发光基团的抑制,实现荧光信号积累与 PCR 的同步进行,从而能较好地地区分野生型、纯合突变和杂合突变样本。TaqMan-MGB 在单核苷酸多态性检测方面有较多的应用<sup>[35-37]</sup>,如慢性骨髓增殖性疾病、病原微生物的耐药突变和某些肿瘤细胞基因突变检测等。

## 3 总结

基因检测的结果是概率性的而不是决定性的,所以必须根据患者的病史和家族史来解释检测结果,并且在特殊情况下应考虑遗传病因。根据目前所研究的结果及 ACMG-AMP 指南,笔者认为,在 HCM 患者的基因检测工作中:(1)若根据目前对基因和/或变异组的现有知识已确定了心血管表型,采用常规方法进行评估;(2)若未在个体中识别出心血管疾病表型,可进行定期筛查;(3)若未在个体中识别出心血管疾病表

型,但在亲属中已检测出该疾病的基因突变体,根据该病变的发病特征及该基因或变体组一般年龄和系谱信息,则可考虑对高危亲属进行基因方面的联级评估,及时发现该家族中致病基因的携带情况。

随着基因工程技术的发展,HCM 的治疗方向已慢慢向基因与分子靶向技术转变,从根源上探究这种疾病的发病机制,对 HCM 的治疗有明确的指导意义。

### 参考文献

- [1] 庞明杰,丁筱雪,张艳,等. 云南省一家族性肥厚型心肌病家系的基因筛查及临床特征分析[J]. 中华心血管病杂志,2018,46(11):887-891.
- [2] Maron BJ,Estes NA 3rd,Maron MS,et al. Primary prevention of sudden death as a novel treatment strategy in hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2003,107(23):2872-2875.
- [3] de Gregorio C,Andò G. Risk of sudden death and outcome in patients with hypertrophic cardiomyopathy with benign presentation and without risk factors:a word of comfort to younger patients?[J]. Am J Cardiol,2014,114(3):500-501.
- [4] 陶阳,褚志刚. 肥厚型心肌病 MRI 延迟强化的研究进展[J]. 解放军医学杂志,2018,43(8):80-85.
- [5] McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G. Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies[J]. Circ Res,2017,121(7):722-730.
- [6] 曹博涵,吴光哲. 肥厚型心肌病研究进展[J]. 临床军医杂志,2020(4):469-471.
- [7] 陆静. 肥厚型心肌病的临床表现及心电图特点[J]. 影像研究与医学应用, 2020,4(4):191-192.
- [8] Authors/Task Force members, Elliott PM, Anastasakis A, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology(ESC)[J]. Eur Heart J,2014,35(39):2733-2779.
- [9] 黄蕾,秦显雨,吴岳恒,等. 肥厚型心肌病相关基因的生物信息学分析[J]. 岭南心血管病杂志,2020,26(1):97-103.
- [10] Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy:a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation[J]. Cell,1990,62(5):999-1006.
- [11] Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years:clinical perspectives[J]. J Am Coll Cardiol,2012,60(8):705-715.
- [12] Watkins H, Conner D, Thierfelder L, et al. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy[J]. Nat Genet,1995,11(4):434-437.
- [13] Burke MA, Cook SA, Seidman JG, et al. Clinical and mechanistic insights into the genetics of cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol,2016,68(25):2871-2886.
- [14] 袁华苑,郭涛. 肥厚型心肌病基因学研究进展[J]. 岭南心血管病杂志, 2019,25(5):106-109.
- [15] Purushotham G, Madhumohan K, Anwaruddin M, et al. The MYH7 p. R787H mutation causes hypertrophic cardiomyopathy in two unrelated families[J]. Exp Clin Cardiol,2010,15(1):e1-e4.
- [16] Akhtar M, Elliott P. The genetics of hypertrophic cardiomyopathy[J]. Glob Cardiol Sci Pract,2018,2018(3):36.
- [17] Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, et al. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene[J]. Circ Cardiovasc Genet,2012,5(1):10-17.
- [18] Sohn DW, Kim HK, Kim YJ, et al. Erratum:cardiomyopathies with mixed and inapparent morphological features in cardiac troponin I3 mutation[J]. Korean Circ J,2017,47(4):540.
- [19] Khoulam A, Kwan A, Baxter S, et al. Factors associated with uptake of genetics services for hypertrophic cardiomyopathy[J]. J Genet Couns,2015,24(5):797-809.
- [20] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants:a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. Genet Med,2015,17(5):405-424.
- [21] Hershberger RE, Givertz MM, Ho CY, et al. Genetic evaluation of cardiomyopathy:a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics(ACMG)[J]. Genet Med,2018,20(9):899-909.
- [22] Alfares AA, Kelly MA, McDermott G, et al. Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: expanded panels offer limited additional sensitivity[J]. Genet Med,2015,17(11):880-888.
- [23] Robyns T, Breckpot J, Nuyens D, et al. Clinical and ECG variables to predict the outcome of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy[J]. Eur J Med Genet,2020,63(3):103754.
- [24] Pett KD, Willett WC, Vartiainen E, et al. The seven countries study[J]. Eur Heart J,2017,38(42):3119-3121.
- [25] Charron P, Dubourg O, Desnos M, et al. Clinical features and prognostic implications of familial hypertrophic cardiomyopathy related to the cardiac myosin-binding protein C gene[J]. Circulation,1998,97(22):2230-2236.
- [26] 张智文,王婷,杨海海. 肥厚型心肌病家系携带 ACTN2, MYBPC3 和 TNNT3 基因突变分析[J]. 临床心血管病杂志,2020,36(2):166-169.
- [27] Walsh R, Mazzarotto F, Whiffin N, et al. Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases:the case of hypertrophic cardiomyopathy[J]. Genome Med,2019,11(1):5.
- [28] 王玉鑫,张世梅,闵婷婷,等. 肥厚型心肌病致病基因热点突变位点 Taqman-MGB 探针检测方法的建立[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020,36(5):117-125.
- [29] Olivetto I, d'Amati G, Basso C, et al. Defining phenotypes and disease progression in sarcomeric cardiomyopathies: contemporary role of clinical investigations[J]. Cardiovasc Res,2015,105(4):409-423.
- [30] Rubattu S, Bozzao C, Pennacchini E, et al. A next-generation sequencing approach to identify gene mutations in early- and late-onset hypertrophic cardiomyopathy patients of an Italian cohort[J]. Int J Mol Sci,2016,17(8):1239.
- [31] Seo J, Kim M, Hong GR, et al. Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy:a practical approach to diagnosis[J]. J Hum Genet,2016,61(9):775-780.
- [32] Viola HM, Hool LC. Impaired calcium handling and mitochondrial metabolic dysfunction as early markers of hypertrophic cardiomyopathy[J]. Arch Biochem Biophys,2019,665:166-174.
- [33] Xiao X, Zhang J, Gong J, et al. Rapid detection of Pseudomonas aeruginosa by the fluorescence quantitative TaqMan PCR assay targeting ETA gene[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao,2008,24(4):581-585.
- [34] Zhang Y, Qu S, Zhao J, et al. A novel RFLP-ARMS TaqMan PCR-based method for detecting the BRAF V600E mutation in melanoma[J]. Oncol Lett,2018,16(2):1615-1621.
- [35] van der Heyden H, Wallon T, Lévesque CA, et al. Detection and quantification of Pythium tracheiphilum in soil by multiplex real-time qPCR[J]. Plant Dis, 2019,103(3):475-483.
- [36] Zhang Z, Liu D, Sun W, et al. Multiplex one-step Real-time PCR by Taqman-MGB method for rapid detection of pan and H5 subtype avian influenza viruses[J]. PLoS One,2017,12(6):e0178634.
- [37] Yang F, Chen B, Liu F, et al. Development of a TaqMan MGB RT-PCR assay for the detection of type A and subtype H10 avian influenza viruses[J]. Arch Virol,2018,163(9):2497-2501.

收稿日期:2020-10-19