

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.10.022

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210401.1509.008.html\(2021-04-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210401.1509.008.html(2021-04-01))

## 法洛四联症与 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'非编码区变异的相关性研究\*

杨小芳,崔芬芬,李元敏<sup>△</sup>,周文君,党国琴,胡源,路宁

(兰州大学第一医院心血管外科,兰州 730000)

**[摘要]** **目的** 探讨法洛四联症(TOF)与 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'非编码区(3'UTR)变异的相关性,为 TOF 患者临床诊断提供遗传依据。**方法** 采用民族-病例-对照的研究方法,收集 20 例汉族 TOF 患者及 14 例回族 TOF 患者,并分别以 20 名汉族及 20 名回族健康体检者为对照组,筛选出 TOF 患者在两个民族人群中,NOTCH1 和 JAG1 基因 3'UTR 存在的变异。通过 PCR 技术,结合 DNA 序列测序,测定、验证、确定样本人群中这些变异位点;进一步运用 TargetScan、PicTar 和 microRNA.org 等软件对变异位点可能结合 miRNA 进行分析,推测其与 TOF 发生、发展的相关性。**结果** 检测出 TOF 患者 NOTCH1 基因 3'UTR 存在 3 个单核苷酸多态性(SNP),JAG1 基因 3'UTR 存在 6 个 SNP 位点。9 个 SNP 位点在 4 组对象中的分布频数存在差异,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。其中 JAG1 基因 3'UTR rs542746042 位点在汉族对照组与汉族病例组之间的分布,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。预测结果显示,JAG1 基因 3'UTR 有差异的 SNP 位点(486delT)可与 miRNA 结合。**结论** NOTCH1 和 JAG1 基因 3'UTR 的核苷酸变异可能与 TOF 的发生相关。

**[关键词]** 法洛四联症;NOTCH1 基因;JAG1 基因;3'非编码区;单核苷酸多态性**[中图法分类号]** R541.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)10-1715-06

## Study on correlation between tetralogy of Fallot and variation of 3'UTR of NOTCH1 and JAG1 genes\*

YANG Xiaofang, CUI Fenfen, LI Yuanmin<sup>△</sup>, ZHOU Wenjun, DANG Guoqin, HU Yuan, LU Ning

(Department of Cardiovascular Surgery, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the correlation between tetralogy of Fallot (TOF) and the variation of 3'UTR of NOTCH1 and JAG1 genes to provide the genetic basis for the diagnosis of the patients with TOF. **Methods** The ethnology case-control study method was adopted, 20 Han cases of TOF and 14 Hui cases of TOF were collected, and 20 Han and 20 Hui subjects undergoing healthy physical examination served as the control group. The existing variations in 3'UTR of NOTCH1 and JAG1 genes in two ethnic groups was screened out. These variation sites in the sample population were detected, verified and confirmed through the PCR technology, combined with DNA sequence sequencing; then the softwares such as TargetScan, PicTar and microRNA.org were used to analyze the possible combination of mutation sites with miRNA, and speculate their correlation with the occurrence and development of TOF. **Results** Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected in the 3'UTR of NOTCH1 gene and six SNPs in the JAG1 3'UTR of TOF patients. The distribution frequency of 9 SNP loci in the 4 groups was different, but the difference was not statistically significant ( $P>0.5$ ). The distribution of 3'UTR rs542746042 loci in JAG1 gene had statistical difference between the Han control group and Han case group ( $P<0.05$ ). The predicted results showed that the SNP site (486delT) with different JAG1 gene 3'UTR could bind to miRNA. **Conclusion** The nucleotide variation of NOTCH1 and JAG1 gene 3'UTR may be related to the occurrence of TOF.

**[Key words]** tetralogy of fallot; NOTCH1 gene; JAG1 gene; 3'untranslated region; single nucleotide polymorphism

\* 基金项目:甘肃省自然科学基金项目(18JR3RA346)。 作者简介:杨小芳(1982—),主治医师,硕士,主要从事心血管外科围术期危重症疾病的诊治研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: ldylylm @163.com。

法洛三联症(TOF)是一种由于胚胎期心脏流出道发育异常所导致的一类典型的先天性心脏病(CHD),是最常见的紫绀型CHD,人群中发病率占CHD的7%~10%。TOF形成的主要因素是在胚胎时期心球与动脉干分割不均匀导致的右心室流出道狭窄,若未行外科手术纠正,90%的患者会在幼年时期死亡<sup>[1]</sup>。有研究表明,TOF是一类由多基因控制的遗传疾病,具有家族遗传的倾向,其发病是遗传和环境因素共同作用的结果<sup>[2-3]</sup>。

NOTCH信号通路是CHD发病相关基因的研究重点,参与调控心脏发育的许多关键点,如调节心脏嵴细胞分化和迁移<sup>[4]</sup>,可导致CHD表现为流出道发育异常,而其分子机制和NOTCH信号通路相关基因突变有关。该通路中两个重要基因NOTCH1和其配体家族的JAG1被发现在胚胎的右心室流出道表达,并且NOTCH1和JAG1基因表达异常可引起心室流出道的发育异常<sup>[5-6]</sup>。NOTCH1和JAG1基因突变不仅与Alagille综合征和Adams-Oliver综合征的CHD相关,还与非综合征型的CHD相关,此类患者通常存在心脏流出道及右心室病变<sup>[7-11]</sup>。所以,NOTCH1和JAG1基因功能突变和CHD有非常密切的关联,两个基因的表达调控,也被认为可以用于临床诊断和遗传分析。目前国内外有关NOTCH信号通路在心脏发育方面的研究主要集中其相关基因的编码区,对于3'非编码区(3'UTR)是否影响CHD的发生研究较少。本研究将进一步探索NOTCH信号通路中NOTCH1和JAG1基因3'UTR存在的变异,探索该区域变异在汉族与回族之间的分布,以及与TOF发生的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择2018年9月至2019年6月就诊于本院的TOF患者,分别选取20例汉族TOF患者及14例回族TOF患者为汉族与回族病例组。其中,汉族病例组:男11例,女9例,年龄1个月至14岁,平均(7.15±3.53)岁。回族病例组:男9例,女5例;年龄1个月至14岁,平均(7.14±4.87)岁。纳入标准:(1)征得伦理委员会批准和患者及其监护人同意。(2)经影像学手段(心脏超声心动图检查、心导管造影术)确诊为

TOF。(3)无其他器官或系统畸形。另外分别选取本院的健康体检者汉族、回族各20名作为汉族与回族对照组,其中,汉族对照组:男11例,女9例;年龄1~15岁,平均(7.85±4.23)岁。回族对照组:男13例,女7例;年龄1~15岁,平均(7.00±3.84)岁。针对检测出的单核苷酸多态性(SNP), $\chi^2$ 检验分析得出其在对照儿童中的基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组DNA提取

每位研究对象采集外周静脉血3~5 mL,采用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,于-80℃冰箱保存。基因组DNA采用血液基因组抽提试剂盒(北京天根公司),提取外周静脉血中淋巴细胞的DNA,样品经琼脂糖电泳检测、测定水平后置于-20℃冰箱保存,用于下一步实验。

#### 1.2.2 目的DNA片段PCR扩增和测序

提取上述并定量检测的DNA,稀释至50 ng/ $\mu$ L,分别用NOTCH1和JAG1特异性引物(表1)进行扩增。扩增程序分别为:94℃预变性5 min,94℃变性50 s,退火(NOTCH1为55℃、JAG1为50℃)50 s,72℃延伸90 s,共37个循环,再72℃延伸10 min。PCR产物经电泳检测后,送由北京六合华大基因有限公司进行测序分析。应用Chromas 2.21软件分析DNA测序结果的峰图,并运用NCBI Blast软件将测序结果与GenBank中人NOTCH1和JAG1基因序列进行比对,验证是否存在核苷酸变异。

#### 1.2.3 3'UTR功能预测

采用Targetscan、microRNA.org和PicTar等3个在线软件,预测NOTCH1或JAG1基因3'UTR区变异位点结合的可能miRNA。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS11.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以非参数检验验证汉族对照组与回族对照组中各SNP的基因型分布是否符合Hardy-Weinberg平衡,汉族病例组与对汉族照组、回族病例组与回族对照组、汉族对照组与回族对照组及汉族病例组与回族病例组之间分布是否有差异。计数资料以率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 验证NOTCH1和JAG1基因3'UTR区变异位点的引物

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	目的片段长度(bp)
NOTCH1	AAG CCT TCG GGC GTC TGT	GCT CTG GCA AGT CTC CTA CAA	1 030
JAG1	TAC CCT GGT TGT GTG TCC	TTC CTC CAT CCC TCT GTC	1 435

## 2 结果

### 2.1 NOTCH1和JAG1基因3'UTR存在SNP位点

测序结果显示,在病例组与对照组中,NOTCH1基因3'UTR存在3个SNP位点:126A/G(rs3124591)、



续表 2 NOTCH1 基因 3'UTR 区各 SNP 位点基因型及等位基因在 4 组间的分布[n(%)]

SNP 位点	基因型及 等位基因	汉族对照组 [A,n=20]	回族对照组 [B,n=20]	汉族病例组 [C,n=20]	回族病例组 [D,n=14]	A/B		C/D		A/C		B/D	
						$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
	GG	0	0	0	0								
	C	40(100.0)	40(100.0)	39(97.5)	27(96.4)	1.00	1.00	1.00	0.66	1.00	0.50	0.41	0.41
	G	0	0	1(2.5)	1(3.6)								

表 3 JAG1 基因 3'UTR 区各 SNP 位点基因型及等位基因在 4 组间的分布

SNP	基因型及 等位基因	汉族对照组 [A,n=20]	回族对照组 [B,n=20]	汉族病例组 [C,n=20]	回族病例组 [D,n=14]	A/B		C/D		A/C		B/D	
						$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
rs542746042	GG	20(100.0)	20(100.0)	17(85.0)	12(85.7)	1.00	1.00	0.93	0.93	0.20	0.11	0.22	0.16
	GA	0	0	2(10.0)	1(7.1)								
	AA	0	0	1(5.0)	1(7.1)								
	G	40(100.0)	40(100.0)	36(90.0)	25(89.3)	1.00	1.00	1.00	0.61	0.12	0.04	0.07	0.07
	A	0	0	4(10.0)	3(10.7)								
rs3842434	TT	1(5.0)	0	0	0	0.58	0.48	1.00	0.51	0.58	0.48	1.00	0.51
	T/-	5(25.0)	6(30.0)	6(30.0)	5(35.7)								
	-/-	14(70.0)	14(70.0)	14(70.0)	9(64.3)								
	T	7(17.5)	6(15.0)	6(15.0)	5(17.9)	1.00	0.50	0.75	0.50	1.00	0.50	0.75	0.50
	-	33(82.5)	34(85.0)	34(85.0)	23(82.1)								
rs7828	TT	13(65.0)	14(70.0)	14(70.0)	10(71.4)	0.24	0.16	0.44	0.37	1.00	0.50	0.96	0.96
	TG	7(35.0)	4(20.0)	6(30.0)	3(21.4)								
	GG	0	2(10.0)	0	1(7.1)								
	T	33(82.5)	32(80.0)	34(85.0)	23(82.1)	1.00	0.50	0.75	0.50	1.00	0.50	1.00	0.54
	G	7(17.5)	8(20.0)	6(15.0)	5(17.9)								
rs3840074	-/-	15(75.0)	13(65.0)	14(70.0)	10(71.4)	0.15	0.10	1.00	0.69	0.22	0.15	1.00	0.50
	-/T	3(15.0)	7(35.0)	6(30.0)	4(28.6)								
	T/T	2(10.0)	0	0	0								
	-	33(82.5)	33(82.5)	34(85.0)	24(85.7)	1.00	1.00	1.00	0.61	1.00	0.50	1.00	0.50
	T	7(17.5)	7(17.5)	6(15.0)	4(14.3)								
rs571057258	-/-	20(100.0)	20(100.0)	19(95.0)	12(85.7)	1.00	1.00	0.56	0.37	1.00	0.50	0.16	0.16
	-/T	0	0	1(5.0)	2(14.3)								
	T/T	0	0	0	0								
	-	40(100.0)	40(100.0)	39(97.5)	26(92.9)	1.00	1.00	0.56	0.39	1.00	0.50	0.17	0.17
	T	0	0	1(2.5)	2(7.1)								
rs8708	AA	15(75.0)	12(60.0)	13(65.0)	6(42.9)	0.20	0.11	0.16	0.11	0.73	0.37	0.53	0.53
	AG	5(25.0)	5(25.0)	7(35.0)	6(42.9)								
	GG	0	3(15.0)	0	2(14.2)								
	A	35(87.5)	29(72.5)	33(82.5)	18(64.3)	0.16	0.08	0.10	0.08	0.76	0.38	0.60	0.32
	G	5(12.5)	11(27.5)	7(17.5)	10(35.7)								

### 3 讨 论

NOTCH 信号通路是一种在进化上高度保守的信号通路,与心肌细胞分化、心室腔发育、房室间隔形成、瓣膜发育、流出道重塑及动静脉分化等过程的调控密切相关<sup>[12-15]</sup>。该通路共由 4 种受体(NOTCH

1~4)和 5 种配体(JAG1 和 JAG2、DLL1、DLL2、DLL3)组成<sup>[16]</sup>,其受体及配体编码基因的表达异常,可能对 CHD、风湿性心脏病及冠心病的发生、发展具有重要影响<sup>[17-20]</sup>。该通路中的两个重要基因,NOTCH1 和 JAG1 通常被用于 CHD 的临床检测和

遗传规律分析。miRNA 是一类非编码小 RNA,目前发现约有 30% 基因受 miRNA 的调控,其中包括与心脏发育密切相关的基因。近年来,3'UTR 作为转录后调控的位点也引起了人们的关注,其可作为调控基因表达的靶点<sup>[21]</sup>。基因的 UTR 具有调控序列,miRNA 通过与 3'UTR 结合发挥转录后调控作用,因此,这一区域碱基突变有可能导致疾病的发生<sup>[-22-24]</sup>。所以本研究选取了位于 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'UTR 作为研究对象,试图探索 TOF 患者在该两个基因的 3'UTR 是否存在差异。

徐丽娟等<sup>[10]</sup>研究发现,NOTCH1 基因 3'UTR 的 1 个新发突变、JAG1 基因 3'UTR 的 3 个新发突变和 2 个 SNP 位点,人群中的这些变异,提高了其所在区域和一些 miRNA 序列结合的可能性,最终导致靶基因的表达下调,可能与圆锥动脉干畸形等疾病的发生相关。本研究发现,TOF 患者 NOTCH1 基因 3'UTR 存在 3 个 SNP 位点的杂合突变,JAG1 基因 3'UTR 存在 6 个 SNP 位点的杂合突变,虽然这些位点与 TOF 的关联不明显,但不能排除这些位点在 TOF 中发挥了一定的作用。但是由于地域限制本研究样本量较少,仅筛查到 JAG1 基因 3'UTR 的 rs542746042 位点与 TOF 具有相关性,该位点突变尚未见相关报道。由此可见,靶基因上游 UTR 序列的突变,尤其是和种子序列互补结合位点的变异,都会影响 miRNA 和 UTR 序列的结合,进而影响靶基因的表达。因此,本研究发现的 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'UTR 突变可能和 TOF 的发生相关。

3'UTR 的 SNP 位点突变可通过改变 mRNA 和 miRNA 之间的亲和力,而达到导致某种疾病易感性增高的作用。应用在线软件进行预测分析后发现 10 个可与 JAG1 基因 3'UTR rs542746042 结合的 miRNA。目前已发现且在人体中证明可影响心脏发育的 miRNA 有 miRNA-10a、miRNA-19b、miRNA-22、miRNA-155、miRNA-487b、miRNA-2223p 等<sup>[25]</sup>。因此,JAG1 可通过与其相关的 miRNA 结合对心脏的发育产生不良影响,导致 TOF 的发生。截至目前,仍有大量的 miRNA 的功能未明确,虽然本研究发现的 miRNA 尚未有文献证实其作用,但在未来的研究中可行进一步的验证研究。

综上所述,本研究对 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'UTR 的变异位点与 TOF 的相关性进行了探讨,发现 JAG1 基因 3'UTR 的一个突变位点与 TOF 的发生或患病易感性相关。另外,本研究还发现了 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'UTR 的多个变异位点,虽然尚未发现和 TOF 的相关性,但仍需进一步的验证和论证,以为 TOF 的产前遗传学咨询、个体化诊断,以及治疗提供遗传基础。

## 参考文献

- [1] VILLAFANE J, FEINSTEIN J A, JENKINS K J, et al. Hot topics in tetralogy of fallot[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(23): 2155-2166.
- [2] HOMSY J, ZAIDI S, SHEN Y, et al. De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies[J]. Science, 2015, 350(6265): 1262-1266.
- [3] MORGENTHAU A, FRISHMAN W H. Genetic origins of tetralogy of fallot[J]. Cardiol Rev, 2018, 26(2): 86-92.
- [4] HIGH F A, EPSTEIN J A. The multifaceted role of notch in cardiac development and disease [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(1): 49-61.
- [5] STITTRICH A B, LEHMAN A, BODIAN D L, et al. Mutations in NOTCH1 cause adams-oliver syndrome[J]. Am J Hum Genet, 2014, 95(3): 275-284.
- [6] PAGE D J, MIOSSEC M J, WILLIAMS S G, et al. Whole exome sequencing reveals the major genetic contributors to nonsyndromic tetralogy of fallot[J]. Circ Res, 2019, 124(4): 553-563.
- [7] PREUSS C, CAPREDON M, WÜNNEMANN F, et al. Family based whole exome sequencing reveals the multifaceted role of notch signaling in congenital heart disease[J]. PLoS Genet, 2016, 12(10): e1006335.
- [8] ZAHAVICH L, BOWDIN S, MITAL S. Use of clinical exome sequencing in isolated congenital heart disease[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2017, 10(3): e001581.
- [9] ANDERSSON E R, CHIVUKULA I V, HANKEOVA S, et al. Mouse model of alagille syndrome and mechanisms of jagged1 missense mutations[J]. Gastroenterology, 2018, 154(4): 1080-1095.
- [10] 徐丽娟, 刘惠东, 徐让, 等. 圆锥动脉干畸形患儿 NOTCH1 和 JAG1 基因 3'非编码区变异分析 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(2): 184-189.
- [11] MISHRA P J, HUMENIUK R, MISHRA P J, et al. A miR-24 microRNA binding site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance[J]. PNAS, 2007, 104(33): 13513-13518.

- [12] PENTON A L, LEONARD L D, SPINNER N B. Notch signaling in human development and disease[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(4): 450-457.
- [13] 宋洋柳. NOTCH 信号通路与先天性心脏病[J]. *国际儿科学杂志*, 2019, 6(46): 391-395.
- [14] MACGROGAN D, MÜNCH J, DE LA POMPA J L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018(15): 685-704.
- [15] DERGILEV K V, ZUBKOVA E S, BELOGLAZOVA I B, et al. Notch signal pathway-therapeutic target for regulation of reparative processes in the heart[J]. *Ter Arkh*, 2018, 90(12): 112-121.
- [16] TALORA C, CAMPESE A F, BELLAVIA D, et al. Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782(9): 489-497.
- [17] GRIDLEY T. Notch signaling in vascular development and physiology[J]. *Development*, 2007, 134(15): 2709-2718.
- [18] SAMIRA K, MAJID M, MOHAMMAD M, et al. A novel de novo dominant mutation of NOTCH1 gene in an Iranian family with non-syndromic congenital heart disease[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(4): e23147.
- [19] HELLE E, CÓRDOVA-PALOMERA A, OJALA T, et al. Loss of function, missense, and intronic variants in NOTCH1 confer different risks for left ventricular outflow tract obstructive heart defects in two European cohorts[J]. *Genet Epidemiol*, 2019, 43(2): 215-226.
- [20] 秦亚录. 风湿性心脏瓣膜病患者外周血单个核细胞及病变瓣膜 Notch 1/Jagged 1 表达变化及其临床意义[D]. 泸州: 泸州医学院, 2011.
- [21] MOUALI Y E, BALSALOBRE C. 3' untranslated regions: regulation at the end of the road[J]. *Curr Genet*, 2019, 65(1): 127-131.
- [22] AFOUDA B A, LYNCH A T, DE PAIVA ALVES E, et al. Genome-wide transcriptomics analysis identifies sox7 and sox18 as specifically regulated by gata4 in cardiomyogenesis[J]. *Dev Biol*, 2018, 434(1): 108-120.
- [23] 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.
- [24] MICHALOVA E, VOJTESEK B, HRSTKA R. Impaired premRNA processing and altered architecture of 3' untranslated regions contribute to the development of human disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8): 15681-15694.
- [25] LI D, JI L, LIU L, et al. Characterization of circulating micro-RNA expression in patients with a ventricular septal defect[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106318.

(收稿日期: 2020-06-01 修回日期: 2021-03-31)

(上接第 1714 页)

- [11] GEORGIU C, OPINCARIU I, CEBOTARU C L, et al. Intracranial immature teratoma with a primitive neuroectodermal malignant transformation-case report and review of the literature[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57(4): 1389-1395.
- [12] LOOI W S, LOW D Y C, LOW S Y Y, et al. Neonatal orbital swelling due to intracranial teratoma[J]. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2019, 104(4): 365.
- [13] HAMED E S, EL-DIN M H N, ABDELAZIM I A, et al. Prenatal diagnosis and immediate successful management of isolated fetal epignathus[J]. *J Med Ultrasound*, 2019, 27(4): 198-201.
- [14] KITAHARA T, TSUJI Y, SHIRASE T, et al. Neoadjuvant chemotherapy for facilitating surgical resection of infantile massive intracranial immature teratoma[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2016, 238(4): 273-278.
- [15] NARIAI H, PRICE D E, JADA A, et al. Prenatally diagnosed aggressive intracranial immature teratoma-clinicopathological correlation[J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2016, 35(4): 26.

(收稿日期: 2020-05-28 修回日期: 2021-01-12)