

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00374

## 单纯性先天性心脏病中 *TBX5* 基因表达异常的机制

辛娜, 邱广蓉, 官立国, 徐小延, 孙开来

中国医科大学医学遗传学教研室, 沈阳 110001

**摘要:** 为探讨人类单纯性先天性心脏病患者中 *TBX5* 基因表达下调的可能原因, 应用变性高效液相色谱 (DHPLC) 方法检测 100 例单纯性先天性心脏病患者中 *TBX5* 基因上游 1 200 bp 调控区的突变情况; 应用甲基化敏感性限制性内切酶 (MS-RE) 法检测 50 例单纯性先天性心脏病患者和 5 例非先天性心脏病患者心肌组织 *TBX5* 基因启动子区两个 CpG 岛 (转录起始点上游 -49~-188 bp 和 -247~-464 bp 处) 的甲基化情况; 应用 P-match 软件预测小鼠 *Tbx5* 基因上游转录因子 Nkx2-5 的结合位点, 构建 *Nkx2-5* 表达载体转染小鼠 H9C2(2-1) 心肌细胞, RT-PCR 及 Western blotting 检测 *Tbx5* 基因表达, 凝胶阻滞实验 (EMSA) 验证 *Nkx2-5* 和 *Tbx5* 基因的作用。结果在 100 例单纯性先天性心脏病患者中, 未检测到 *TBX5* 基因上游 1 200 bp 调控区突变; 非先天性心脏病患者和单纯性先天性心脏病患者在两个 CpG 岛存在相同的甲基化; 小鼠 *Tbx5* 基因转录起始点上游 -312~-315 bp 可能存在 Nkx2-5 的结合位点, 转染 *Nkx2-5* 表达载体后 *Tbx5* 基因在 mRNA 及蛋白质水平均有表达增高趋势, Nkx2-5 在体外可以与 *Tbx5* 基因上游 -312~-315 bp 序列相结合。以上结果提示 *TBX5* 基因调控区突变和两个 CpG 岛的甲基化不是单纯性先天性心脏病患者心肌组织中 *TBX5* 基因表达下调的原因, *TBX5* 基因表达下调可能由于 *NKX2-5* 的表达异常引起。

**关键词:** 先天性心脏病; *TBX5*; *NKX2-5*

## The mechanism of *TBX5* abnormal expression in simple congenital heart disease

XIN Na, QIU Guang-Rong, GONG Li-Guo, XU Xiao-Yan, SUN Kai-Lai

Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China

**Abstract:** To explore the mechanism of *TBX5* abnormal expression in simple congenital heart disease (CHD), 100 CHD venous blood, 50 CHD heart tissues, and 5 non-CHD heart tissues were involved in this study. The mutation and methylation in the 1 200 bp region upstream of *TBX5* gene were detected by high-performance liquid chromatography (DHPLC) and methylation-sensitive restriction endonuclease (MS-RE), respectively. The binding site of *NKX2-5* to *Tbx5* predicted by P-MATCH software was validated by EMSA (Electrophoretic mobility shift assay). *Tbx5* gene expression in mouse cardiac muscle cell H9C2(2-1) transfected with *NKX2-5* expression vector was evaluated. No mutation was found in all patients. Both non-CHD and CHD heart tissues had the same methylation in the two CpG islands. Exogenous *Nkx2-5* efficiently activated the transcription of the endogenous *Tbx5* gene in H9C2 (2-1) cells. EMSA showed that the special binding band appeared when *Nkx2-5* existed. These results indicates that the down expression of *TBX5* might not be caused by mutation

收稿日期: 2008-09-16; 修回日期: 2008-12-25

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30070411, 30200305, 30400485)项目; 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: Z19-01-01-03); 辽宁省教育厅基金项目(编号: 202013133, 2004C045, 20060951)资助

作者简介: 辛娜(1980-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 先天畸形发育遗传学。Tel: 024-23256666-5305; E-mail: znnadi@163.com

通讯作者: 孙开来(1934-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 先天畸形发育遗传学。Tel: 024-23265842; E-mail: klsun@mail.cmu.edu.cn

and methylation in the 1 200 bp region upstream of gene, and might be regulated by abnormal expression of *NKX2-5* gene in heart muscle of CHD.

**Keywords:** Congenital heart disease; *TBX5*; *NKX2-5*

先天性心脏病(Congenital heart disease, CHD)是最常见的出生缺陷性疾病,发生率为活产儿的1%和自然流产的10%。先天性心脏病是一种复杂疾病,难以预防和预后,因此先心病的早期诊断及预防措施的研究对降低围产儿畸形的发生率具有十分重要的意义。心脏发育是一个极其复杂的过程,它不仅涉及不同时间、不同空间若干基因的先后表达,也涉及细胞的迁移、分化、增殖及细胞间的相互作用。国外学者应用荧光原位杂交、免疫组化和基因剔除(Gene knockout)等技术,已经发现和鉴定了许多与胚胎心脏发育有关的基因,如 *Nkx2-5*<sup>[1]</sup>、*Tbx5*<sup>[2]</sup>、*Gata4*<sup>[3,4]</sup>、*Pitx2*<sup>[5]</sup>、*erbB2*<sup>[6]</sup>、*Mef2c*<sup>[7]</sup>、*dHAND*<sup>[8-10]</sup>、*Endothelin*<sup>[11]</sup>、*Irx4*<sup>[12,13]</sup>、*Ufd1*<sup>[14]</sup>、*NF-ATc*<sup>[15,16]</sup>、*Sox-6*<sup>[17]</sup>等。

上述的众多与胚胎心脏发育相关的基因中仅 *NKX2-5* 基因的突变被证实与人类单纯性CHD相关。我室前期研究结果也发现在单纯性CHD患者中 *NKX2-5* 基因mRNA表达呈下降趋势<sup>[18]</sup>。

*TBX5* 基因是近几年发现的、在心脏发育过程中起重要作用的候选基因。该基因于1997年在Holt-Oram综合征(HOS)(属常染色体显性遗传病,表现为以房间隔缺损(ASD)为主的心脏异常和上肢不同部位、不同程度的畸形)中被鉴定并克隆<sup>[19]</sup>。国外研究已证实 *TBX5* 基因突变将导致HOS和单纯性CHD的发生<sup>[20]</sup>。我室前期研究结果提示与正常对照相比,单纯性CHD患者 *TBX5* 基因mRNA表达水平呈下降趋势,推测可能是其参与单纯性CHD发生的机制<sup>[21]</sup>。

真核生物基因结构复杂,表达调控涉及多层次、多水平,如转录水平、转录后水平、翻译水平、翻译后水平等,其中转录水平的表达调控尤为重要。*TBX5* 基因 mRNA 水平表达下降与该基因启动子区域的突变、甲基化以及与 *TBX5* 基因调控序列相结合的转录因子的异常可能有关。因为单纯性CHD主要是在胎儿发育阶段产生,但是人胚胎时期

的心肌组织难以获得,而小鼠的 *Nkx-25* 和 *Tbx5* 基因与人类高度同源,所以采取小鼠胚胎作为研究对象。应用 P-match 软件我们预测到小鼠 *Tbx5* 基因上游-312~-315 bp 处存在 *Nkx2-5* 的结合位点,而本室前期研究表明在单纯性CHD患者中 *NKX2-5* 基因表达下调。因此,本实验主要对转录水平可能影响 *TBX5* 基因表达的因素进行分析以进一步明确影响该基因表达异常的原因,包括 *TBX5* 基因调控序列的突变和甲基化情况及其上游调控基因的作用,进而揭示 *TBX5* 基因参与CHD发生的可能分子机制,为更好的理解心脏发育过程中 *TBX5* 的调控通路提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

所有对象均来自东北地区。100例单纯性先天性心脏病患者静脉血,50例单纯性先天性心脏病患者心肌组织,5例非CHD患者正常对照心肌组织(3例粘液瘤,2例足月引产胎儿),均来自沈阳军区总医院(获家属知情许可)。10只小鼠孕鼠购自我校实验动物部,小鼠 H9c2(2-1)心肌细胞购自 ATCC 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *TBX5* 基因启动子区域突变筛查

饱和 NaCl 方法提取 100 例单纯性先天性心脏病患者静脉血 DNA。获取 *TBX5* 基因转录起始点上游 1 200 bp 的基因序列(www.ensembl.org),应用 Primer3 设计两对 PCR 扩增引物使 PCR 所扩增的序列涵盖这个区域,引物序列分别为: F: 5'-GGGCAA GTCCAGATTCAGA-3'; R: 5'-GGGACTGAGGTCT CTTGCAT-3', 扩增长度 636 bp; F: 5'-ATCCCATGCC TTATGCAAGA-3'; R: 5'-CACCTCCAACCTATCCCA CCT-3', 扩增长度 630 bp。两对引物分别加入 25  $\mu$ L PCR 反应体系中,PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,

94 变性 45 s, 52 /55 复性 45 s, 72 延伸 45 s, 共 35 个循环。PCR 产物应用高效变性液相色谱 (DHPLC) 筛查突变情况, 对可疑产物进行测序验证。

#### 1.2.2 应用甲基化敏感性限制性内切酶酶切方法检测 TBX5 基因启动子区甲基化

饱和 NaCl 方法提取 50 例单纯性先天性心脏病患者心肌组织和 5 例正常人心肌组织 DNA。应用 Methprimer 软件预测到 TBX5 启动子区存在两个 CpG 岛 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>), 分别位于转录起始点上游 -49~-188 bp 和 -247~-464 bp 处。两个 CpG 岛均为 CGCG 重复。应用软件 Primer 3 分别对这两个 CpG 岛区域进行引物设计, 引物序列分别为: F: 5'-CCCCTTGGCGGAGAACTT-3'; R: 5'-AGCAGCGCAGTGGTGGAT-3', 扩增长度 176 bp; F: 5'-GCAAGGCACATTACGGAG-3'; R: 5'-TGCATAAGGCATGGGATC-3', 扩增长度 211 bp。本研究所使用的甲基化敏感性限制性内切酶为 BstI (识别序列 CGCG), 当序列中的胞嘧啶发生甲基化时, BstI 不切割。将 50 例单纯性先天性心脏病患者心肌组织和 5 例正常人心肌组织 DNA 进行 60 过夜消化、酶切, 酶切产物作为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, PCR 反应条件为 94 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 55 /56 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 共 35 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶分离, 出现目的片段提示有甲基化存在, 没有目的片段则提示没有甲基化存在。

#### 1.2.3 Nkx2-5 表达载体转染小鼠心肌细胞

在单纯性 CHD 患者中均存在 TBX5 基因和 NKX2-5 基因的表达下调<sup>[18,21]</sup>, 所以我们推测这两个基因之间是否存在表达调控的作用。常规培养小鼠 H9c2(2-1) 心肌细胞, 转染 Nkx2-5 表达载体(我室前期已构建成功), 转染前一天调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$ , 以每孔 2 mL 接种于 6 孔板中培养 24 h。采用 Invitrogen 公司的 Lipofectamine2000 进行转染。首先在两个无菌 Eppendorf 管中加入 250  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养基, 然后分别加入 12  $\mu$ L 转染剂和 4  $\mu$ g 质粒, 混匀, 室温放置 5 min, 再将两个管混合, 室温放置 30 min。将混合物加至接种细胞的孔中, 均匀分散, 继续培养至 48 h。用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 核蛋白提取试剂盒(pierce)提取细胞核蛋白。

RT-PCR 及 Western Blot 方法检测 Tbx5 基因在转染 Nkx2-5 表达载体 48 h 后的表达情况, 以转染空质粒为阴性对照。如果转染 Nkx2-5 表达载体 48 h 以后实验组 Tbx5 表达量高于对照, 说明 Nkx2-5 可能对 Tbx5 基因有调控作用。RT-PCR 引物序列为: F: 5'-GAGTGTCTGAGTCCCATCC-3'; R: 5'-CCAGGGCTCTTTCAGTTTAT-3', 扩增长度为 673 bp。 $\beta$ -actin 作为内对照, 扩增长度 507 bp。引物加入 25  $\mu$ L PCR 反应体系中, PCR 反应条件为 94 预变性 5 min, 94 变性 45 s, 55 复性 45 s, 72 延伸 60 s, 共 35 个循环。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶分离, 用 AlphaImage2000 自动成像仪(Alpha Innotech Corp, San Jose, CA) 摄影, 用 Fluorchem v2.0 Stan Alone 软件分析 RT-PCR 产量, 通过灰度值判断表达量的改变。

#### 1.2.4 凝胶阻滞实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)验证 Nkx2-5 对 Tbx5 的调控作用

为了探讨在胚胎时期心脏发育中 Tbx5 基因的调控机制, 我们以孕 13 d 的小鼠胚胎(人胚不易获得所以我们选取 Tbx5 基因与人高度同源的小鼠胚胎)为研究对象。利用 P-match 软件预测 Tbx5 基因上游 600 bp 序列的转录因子结合位点, Tbx5 基因转录起始点上游 -312~-315 bp 可能存在 Nkx2-5 的结合位点。以核心序列 TAATT 为中心, 合成正常探针及位点特异突变探针(上海博亚), Nkx2-5 consensus 探针购自 Promega 公司。3' 末端用生物素标记探针用于 EMSA 实验。Nkx2-5: 5'-CTGGTACAATAATTATTC-3 是预测到的 Nkx2-5 结合 Tbx5 的位点, Nkx2-5mut: 5'-CTGGTACAATGGCTATTC-3 是预测到的 Nkx2-5 结合位点的突变探针, Nkx2-5 consensus: 5'-TCGGGATCCGAGTTAATTGCGC-3 为 Nkx2-5 的已知结合位点。

提取新鲜孕 13 d 胎鼠心肌组织核蛋白用于 EMSA 实验。结合体系混匀后室温结合 60 min 后 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜、化学发光检测后观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 TBX5 基因启动子区域突变筛查结果

分别对 100 例单纯性 CHD 患者 DNA 的 TBX5 基因转录起始点上游 1 200 bp 进行 PCR 扩增, PCR

产物进行 DHPLC 筛查,发现有 1 例患者的流出峰位置与常人疑似不同,但经 DNA 测序后发现与正常人的测序结果没有异常。DHPLC 结果见图 1A,单纯性 CHD 患者 DNA 测序结果见图 1B,正常人 DNA 测序结果见图 1C,所以在 100 例单纯性 CHD 患者静脉血 *TBX5* 基因 1 200 bp 的调控区中未发现有突变存在。

## 2.2 *TBX5* 基因启动子区甲基化检测结果

Methprimer 软件预测 *TBX5* 启动子区存在两个

CpG 岛,分别位于转录起始点上游-49~-188 bp 和 -247~-464 bp 处。经 *Bst*u I 酶切后进行 PCR 扩增,转录起始点上游-49~-188 bp 处的扩增结果见图 2,转录起始点上游-247~-464 bp 处的扩增结果见图 3。结果 CHD 患者的心肌组织与正常人的心肌组织经 PCR 扩增后均出现目的片段,所以,单纯性 CHD 患者的心肌组织中两个 CpG 岛的甲基化情况与正常人心肌组织的甲基化情况相比未见异常。

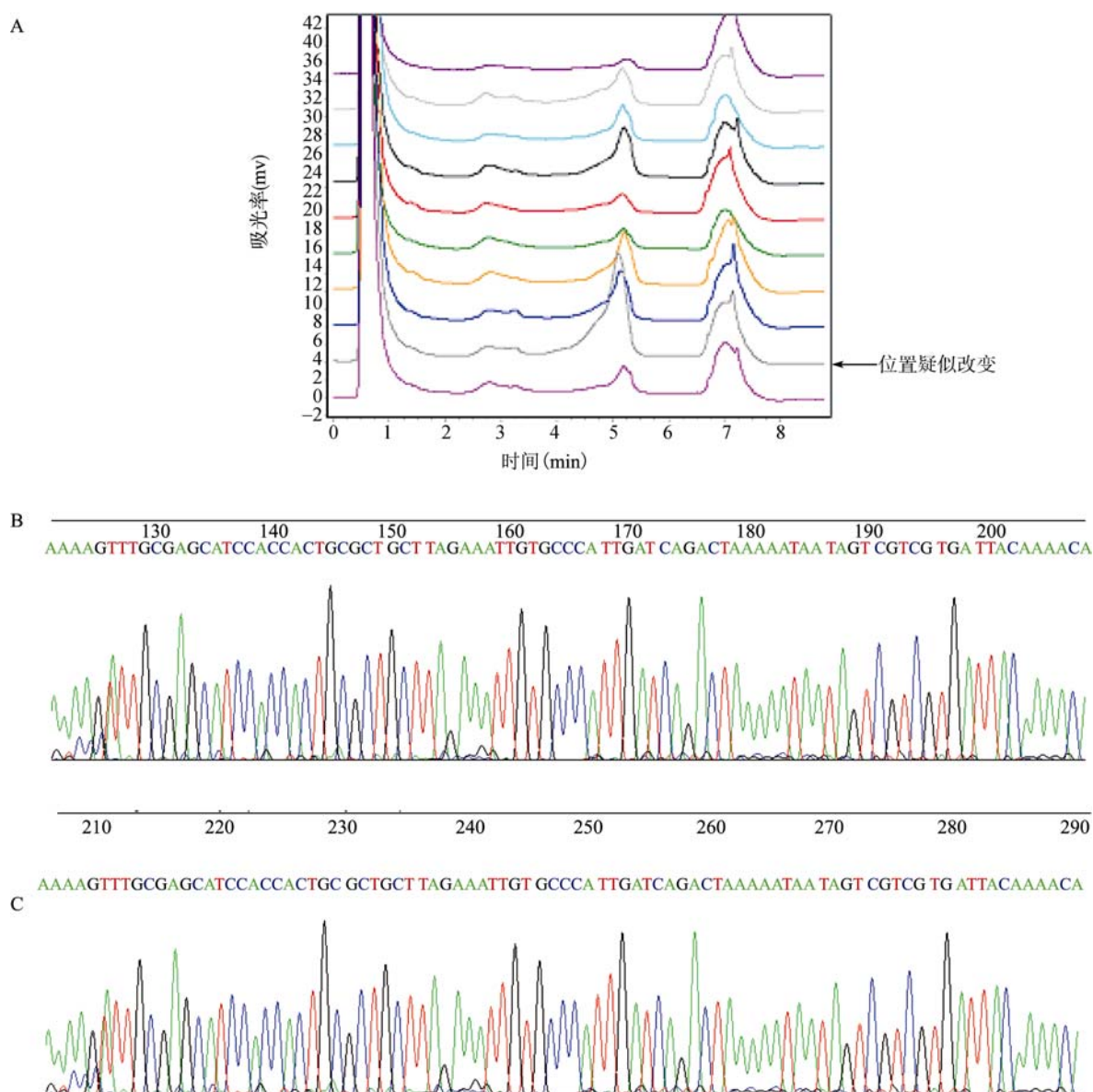


图1 *TBX5* 基因启动子区域突变筛查结果

A: DHPLC 流出峰; B: CHD 患者测序结果; C: 正常人测序结果。



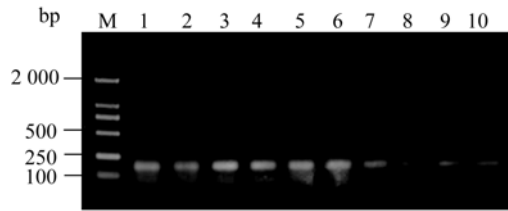


图2 转录起始点上游 49~188 bp 处的 CpG 岛经 *Bst*u I 酶切后的 PCR 扩增结果

1~5: 正常心肌组织; 6~10: 单纯性 CHD 患者心肌组织; M: DL2000 Marker。

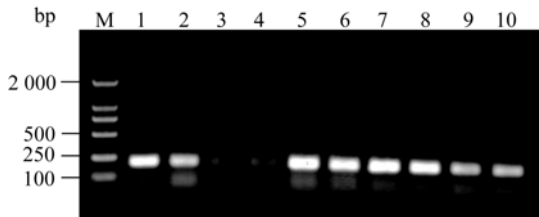


图3 转录起始点上游 247~464 bp 处的 CpG 岛经 *Bst*u I 酶切后的 PCR 扩增结果

1~5: 正常心肌组织; 6~10: 单纯性 CHD 患者心肌组织; M: DL2000 Marker。

### 2.3 转染 *Nkx2-5* 表达载体后 *Tbx5* 基因表达的改变

*Nkx2-5* 表达载体转染小鼠 H9c2(2-1)心肌细胞后 48 h, 应用半定量 PCR 和 Western blotting 方法分别从 mRNA 水平和蛋白质水平检测 *Tbx5* 基因在表达水平的改变。RT-PCR 结果见图 4A; Western blotting 结果见图 4B。结果表明在 mRNA 和蛋白质水平均有明显表达上调趋势。

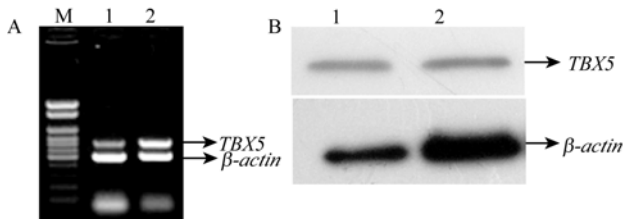


图4 转染 *Nkx2-5* 表达载体后 *Tbx5* 在小鼠心肌细胞中的表达

A: RT-PCR 结果。1: 转染空质粒的阴性对照, 转染后/ $\beta$ -actin 的灰度值为 0.45; 2: 转染 *Nkx2-5* 表达载体的细胞, 转染后 48 h/ $\beta$ -actin 的灰度值为 0.76, 转染后/转染前灰度值=1.69。M 为 100 bp DNA ladder。B: Western blotting 结果。1: 转染空质粒的阴性对照, 转染前/ $\beta$ -actin 的灰度值为 2.89; 2: 转染 *Nkx2-5* 表达载体的细胞, 转染后 48 h/ $\beta$ -actin 的灰度值为 4.37, 转染后/转染前灰度值=1.52。

### 2.4 凝胶阻滞实验结果

应用 P-match 软件预测到 *Tbx5* 基因转录起始点上游-312~-315 bp 可能存在 *Nkx2-5* 的结合位点, EMSA 结果见图 5。*Nkx2-5* 探针能与核蛋白结合, 且能被 100 倍的过量未标记探针竞争抑制, TAATT 核心序列改变后, 抑制作用消失, 显示条带位置与 *Nkx2-5* 已知探针相同, 推测结合蛋白为 *Nkx2-5*。所以我们推测 *Tbx5* 基因转录起始点上游-312~-315 bp 存在 *Nkx2-5* 的结合位点。

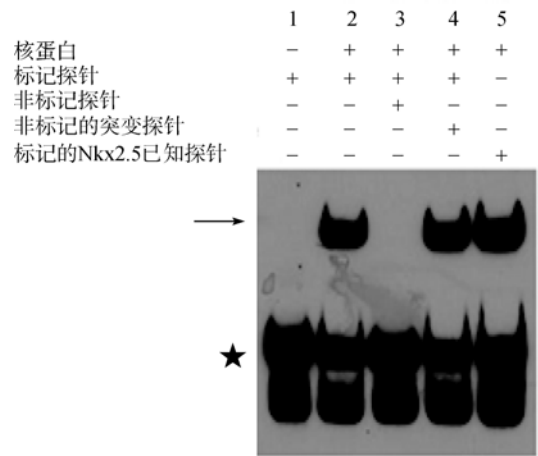


图5 *Nkx2-5* 特异结合 *Tbx5* 上游的片段  
箭头所指为 DNA 阻滞条带; 星形标志所指为 DNA 游离探针。

### 3 讨论

*T-box* 基因家族在进化过程中高度保守, 作为转录因子调控胚胎的生长发育。*TBX5* 基因是 *T-box* 基因家族的重要成员, 在胚胎早期阶段控制着心脏发育和上肢形成<sup>[22]</sup>。人类 *TBX5* 基因于 1997 年在 Holt-Oram 综合征 (Holt-Oram syndrome, HOS) 中被克隆鉴定。该基因定位于 12q24.1, cDNA 全长 2 133 bp, 含有 8 个外显子, 编码 518 个氨基酸。作为一种转录因子, *TBX5* 主要通过其特有的 T-BOX 结构域与下游靶基因结合, 调控正常的心脏发育。*TBX5* 基因参与心脏发育全过程的调控, 其在时间和空间上的精确表达对于房室腔初始分化、心室和心脏间隔的正确形成是十分关键的。*TBX5* 基因过表达或表达剂量不足都将引起心脏畸形的发生<sup>[23]</sup>。本课题组前期研究结果显示, 与正常对照相比, CHD 患者心肌组

织中 *TBX5* 基因 mRNA 水平(RT-PCR)表达下调, *TBX5* 基因表达异常可能参与单纯性CHD的发生机制<sup>[21]</sup>。

真核生物结构基因的启动子具有起始转录和提高转录效率的作用,若启动子区域发生突变,则可以影响RNA聚合酶II与mRNA的结合,或者造成转录起始点的错误,从而降低转录效率,使相应基因表达产物降低或缺失。DNA甲基化是一种表观遗传修饰,通过基因启动子区及附近区域CpG岛胞嘧啶的甲基化可以在转录水平调节基因的表达。在本研究中,我们预测 *TBX5* 基因启动子的位置(<http://www.softberry.com>),获取了转录起始点上游包括启动子的1200 bp序列。一方面应用DHPLC技术在100例单纯性CHD患者中进行突变筛查,一方面通过生物软件预测了 *TBX5* 基因启动子区域存在2个CpG岛,这两个CpG岛存在相同的潜在甲基化位点CGCG,应用甲基化敏感性限制性内切酶法对其甲基化情况进行了检测。结果有一例患者流出峰与常人疑似有改变但经过测序对比后未见碱基改变,可能是PCR产物纯度不够引起,所以未发现 *TBX5* 基因上游1200 bp序列中存在碱基改变。在上述2个CpG岛,正常人和CHD患者存在相同的甲基化。提示 *TBX5* 基因启动子区域的突变和上述两个位点甲基化可能不是引起单纯性CHD患者 *TBX5* 基因表达下调的原因。那么 *TBX5* 基因表达下调是否和其上游的转录因子有关呢?

NKX2-5和*TBX5*是胚胎发育过程中起着重要作用的高度保守的转录因子。*NKX2-5* 基因表达是体细胞分化的最早期标志之一,对于果蝇、小鼠及人类心脏的正常发育是必需的<sup>[24]</sup>。在心脏发育过程中,作为上游主基因, *NKX2-5* 调控许多下游基因的表达。人和小鼠的 *NKX2-5* 和 *TBX5* 基因在结构和功能上是高度同源的。所以我们选取小鼠心肌细胞作为转染对象, *Nkx2-5* 表达载体转染小鼠H9c2(2-1)细胞48 h后, *Tbx5* 基因mRNA和蛋白质水平均有表达上调趋势,提示 *Nkx2-5* 可能对 *Tbx5* 表达有上调作用。随后我们应用P-match软件在人 *Tbx5* 基因转录起始点上游-312~-315 bp预测到了 *Nkx2-5* 转录因子的结合元件, EMSA结果进一步证明在体外实验中 *Nkx2-5*

对 *Tbx5* 有直接调控作用。结合我室前期研究结果(与非先天性心脏病患者(正常对照)相比, CHD患者的 *NKX2-5* 基因mRNA表达呈下降趋势)<sup>[18]</sup>, 我们推测单纯性先天性心脏病中 *NKX2-5* 表达下调可能是 *TBX5* 基因表达下调的直接原因,这将为明确单纯性CHD发生的分子机制以及更好的理解心脏发育过程中 *TBX5* 的调控通路提供理论基础。

#### 参考文献(References):

- [1] Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor *Nkx2-5*. *Science*, 1998, 281(5373): 108-111. [\[DOI\]](#)
- [2] Basson CT, Cowley GS, Solomon SD, Weissman B, Poznanski AK, Traill TA, Seidman JG, Seidman CE. The clinical and genetic spectrum of Holt-Oram syndrome. *New Engl J Med*, 1994, 330(13): 885-891. [\[DOI\]](#)
- [3] Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24390-24398. [\[DOI\]](#)
- [4] Garg V, Kathiriyi IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with *TBX5*. *Nature*, 2003, 424(6947): 443-447. [\[DOI\]](#)
- [5] Franco D, Campione M. The role of *Pitx2* during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13(4): 157-163. [\[DOI\]](#)
- [6] Negro A, Brar BK, Lee KF. Essential roles of *Her2/erbB2* in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res*, 2004, 59(1): 1-12. [\[DOI\]](#)
- [7] Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *MEF2C*. *Science*, 1997, 276(5317): 1404-1407. [\[DOI\]](#)
- [8] Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, Srivastava D, Olson EN. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor *Hand1*. *Nat Genet*, 1998, 18(3): 266-270. [\[DOI\]](#)
- [9] Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC. The *Hand1* Bhlh transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat Genet*, 1998, 18(3): 271-275. [\[DOI\]](#)

- [10] Overbeek PA. Right and left go dHAND and eHAND. *Nat Genet*, 1997, 16(2): 119–121. [\[DOI\]](#)
- [11] Luft FC. Endothelin and cardiac development. *J Mol Med*, 2002, 80(11): 685–686. [\[DOI\]](#)
- [12] Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the development heart by *Irx4*. *Science*, 1999, 283(4505): 1161–1164. [\[DOI\]](#)
- [13] Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, Seidman JG, Seidman CE. Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and dHAND. *Dev Biol*, 2000, 127(2): 266–277. [\[DOI\]](#)
- [14] Yamagishi H, Garg V, Matsuoka R, Thomas T, Srivastava D. A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects. *Science*, 1999, 283(4505): 1158–1161. [\[DOI\]](#)
- [15] Bushdid PB, Osinska H, Waclaw RR, Molkentin JD, Yutzey KE. NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ Res*, 2003, 92(12): 1305–1313. [\[DOI\]](#)
- [16] Lange AW, Molkentin JD, Yutzey KE. *DSCR1* gene expression is dependent on NFATc1 during cardiac valve formation and colocalizes with anomalous organ development in trisomy 16 mice. *Dev Biol*, 2004, 266(2): 346–360.
- [17] Cohen-Barak O, Yi Z, Hagiwara N, Monzen K, Komuro I, Brilliant MH. Sox6 regulation of cardiac myocyte development. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(20): 5941–5948. [\[DOI\]](#)
- [18] 孙森, 邱广蓉, 孙桂凤, 袁翼华, 孙开来. 人类单纯性先天性心脏病患者 *Nkx2-5* 基因突变及表达的研究. 中国医科大学学报, 2001, 30(5): 321–324.
- [19] Liberatore CM, Searcy-Schrick R, Yutzey KE. Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol*, 2000, 223(1): 169–180. [\[DOI\]](#)
- [20] Huang T, Lock JE, Marshall AC, Basson C, Seidman JG, Seidman CE. Causes of clinical diversity in human *TBX5* mutations. *Quantitative Biol*, 2002, 67: 115–120.
- [21] 宫立国, 邱广蓉, 邱广斌, 贺光, 孙开来. 人类单纯性先天性心脏病中 *TBX5* 基因的突变及表达研究. 遗传, 2003, 25(5): 39–43.
- [22] Mori AD, Zhu Y, Vahora I, Nieman B, Koshiba-Takeuchi K, Davidson L, Pizard A, Seidman JG, Seidman CE, Chen XJ, Henkelman RM, Bruneau BG. Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev Biol*, 2006, 297(2): 566–586. [\[DOI\]](#)
- [23] Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt–Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell*, 2001, 106(6): 709–721.
- [24] Lincoln J, Alfieri CM, Yutzey KE. Development of heart valve leaflets and supporting apparatus in chicken and mouse embryos. *Dev Dyn*, 2004, 230(2): 239–250. [\[DOI\]](#)

## • 遗传咨询 •

### 兔唇隔代遗传的几率是多大？

问：女方本身没有兔唇，但其母亲有，如果女方结婚后，后代会不会也有兔唇，几率会是多少？

答：兔唇是先天性唇裂(Congenital Cleft Lip)伴或不伴腭裂先天畸形的俗称，与单纯的腭裂是不同的疾病。据统计，我国唇裂群体发病率约 1/500~1000，男性略多于女性。该病属于多基因遗传病，遗传度为 76%，目前认为其发病原因是主基因和多基因遗传结合，其中主基因是隐性的。患者一、二、三级亲属的发病几率分别为 4%、0.7%和 0.3%。女方母亲患有该病，估计女方后代(二级亲属)发病几率为 0.7%。本病主要治疗方案是手术矫正。