

# 先天性心脏病圆锥动脉干畸形 NKX2-5 基因 CpG 岛甲基化状态分析

盛伟<sup>1</sup> 王慧君<sup>2</sup> 马晓静<sup>3</sup> 李文灿<sup>4</sup> 陈龙<sup>4</sup> 张进<sup>1</sup> 黄国英<sup>3</sup> 马端<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 复旦大学上海医学院分子医学教育部重点实验室, 上海 200032; 2. 复旦大学生物医学研究院, 复旦大学出生缺陷研究中心, 上海 200032; 3. 复旦大学附属儿科医院, 复旦大学儿童发育与疾病转化医学研究中心, 上海 200032; 4. 复旦大学法医系, 上海 200032)

**【摘要】** 目的 研究心肌特异性转录因子 NKX2-5 基因启动子区在先天性心脏病圆锥动脉干畸形 (CTD) 病例中的甲基化状态, 从表观遗传学角度探讨先心病的发病机制, 为先心病的早期临床诊治提供理论依据。方法 首先利用 Tru11 限制性内切酶将基因组片段化并接上接头, 然后利用甲基化结合蛋白 (MBD) 与甲基化 DNA 特异性结合的特点对甲基化 DNA 片段进行富集; 针对 NKX2-5 基因启动子区的 CpG 岛设计引物, 通过实时定量 PCR 检测 CTD 与正常胎心组织中 NKX2-5 基因甲基化状态。结果 通过与正常心脏组织相比, NKX2-5 基因在 6 例病变组织中均发生了不同程度的甲基化, 其中 4 例呈现高甲基化, 另外 2 例甲基化程度无明显变化。结论 NKX2-5 基因甲基化可能与先心病 CTD 发病相关, 可能成为先心病早期诊断的分子标志物之一。

**【关键词】** 先天性心脏病; 圆锥动脉干畸形; NKX2-5 基因; 甲基化; 分子标志物

## The CpG Island Methylation Status Analysis in the Promoter Region of the Conotruncal Heart Malformation Candidate Gene NKX2-5

Sheng Wei<sup>1</sup> Wang Hui-jun<sup>2</sup> Ma Xiao-jing<sup>3</sup> Li Wen-can<sup>4</sup> Chen Long<sup>4</sup> Zhang Jin<sup>1</sup> Huang Guo-ying<sup>2</sup> Ma Duan<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Research Center for Birth Defects, Fudan University, Shanghai 201102, China; 3. Research Center for Children Development and Translational Medicine, Children Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】 Objective** To study the promoter methylation status of heart tissue-specific transcription factor NKX2-5 gene between congenital heart conotruncal defects (CTD) and normal fetal cardiac tissue samples, and to investigate the pathogenesis of congenital heart disease from the epigenetic point of view.

**Methods** First, the genome DNA fragments were generated by the Tru11 restriction enzyme and then connected to the adaptor. The methylated DNA fragments were enriched by the methylated binding protein (MBD), which can specifically bind and interact with methyl-CpG island. Finally, the CpG island methylation status in the promoter region of NKX2-5 gene was detected by Real Time PCR. **Results** In 6 CTD cases we detected, 4 showed hypermethylation status in NKX2-5 gene promoter, compared with normal fetal heart tissue. **Conclusion** NKX2-5 gene hypermethylation might be one of molecular marker of congenital heart disease.

**【Key words】** Congenital heart disease; Conotruncal defects; NKX2-5 gene; Methylation; Molecular marker

\* 通讯作者: 马端, Email: duanma@shmu.edu.cn

先天性心脏病(congenital heart disease),简称先心病,是指胚胎发育过程中心脏结构发生异常的一类疾病。近年来出生缺陷调查资料显示,先心病已跃居我国出生缺陷畸形首位,发病率占活产新生儿的 6%~10%<sup>[1]</sup>。圆锥动脉干畸形(congenital heart conotruncal defects,CTD)是先心病中最为严重的一种类型,约占先心病的 30%<sup>[2]</sup>。CTD 是指在遗传和环境因素的共同作用下,胚胎发育早期心脏流出道和大动脉发育异常,临床上表现为法洛三联症、肺动脉闭锁、大动脉转位、右室双出口、永存动脉干等多种复杂心血管畸形,常出现紫绀和低氧血症,是造成我国婴儿和新生儿死亡最主要的原因之一。

心脏特异性转录因子 NKX2-5 高度保守,是脊椎动物心脏发育中较早表达的转录因子,是心脏前体细胞最早的标志物,参与心脏发育的整个过程。NKX2-5 自胚胎发育第 7.5 天开始持续表达,其正常表达对心脏的环化、心房及心室发育、动脉干分隔、房室瓣形成及房室传导的维持均起重要作用<sup>[3]</sup>。动物实验显示,NKX2-5 参与了胚胎心脏发育,是引起心脏畸形的关键因素,敲除 NKX2-5 基因的小鼠胚胎在 10.5 天由于心脏缺失而死亡<sup>[4]</sup>。临床研究显示,NKX2-5 基因在患儿人群中发生突变的比例非常低,如法洛三联症和房间隔缺损患者中仅有 4% 发生突变<sup>[5]</sup>。最近也有学者提出,基因序列的改变不是 NKX2-5 引起心脏畸形的主要原因<sup>[6]</sup>。

除了编码序列改变可以导致基因的功能异常以外,基因启动子区域的甲基化变化也可以影响基因的表达,从而使所编码的蛋白出现量的差异。本研究拟通过比较该基因在正常心脏组织与 CTD 病变组织中的甲基化状态的差异,了解 NKX2-5 基因的甲基化状态与 CTD 的关系,为先心病的早期基因诊断提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Tru11 限制性内切酶购自 Fermentas 公司,IPTG 购自 Promega 公司,蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司,Glutathione Sepharose 4B 购自 GE Health care 公司,组织基因组 DNA 提取

试剂盒购自 AXYGEN 公司,PCR 产物回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,LA Taq 聚合酶、T4 DNA 连接酶和实时定量 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司,所有引物均在上海桑尼生物公司合成。含有 PET4-GST-MBD 重组质粒的大肠杆菌为本实验室保存。

1.1.2 研究材料 正常儿童心脏组织取自复旦大学法医学系。圆锥动脉干畸形病变组织由复旦大学附属儿科医院提供。本研究涉及的人体组织样本均经所有研究对象签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 NKX2-5 基因启动子区 CpG 岛预测及 Real Time PCR 引物设计 登陆 <http://genome.ucsc.edu/> 网站,查找人的 NKX2-5 基因启动子区,通过甲基化分析软件(Methyl Primer Express v 1.0)确定启动子区的 CpG 岛位置,根据 Tru11 限制性内切酶的酶切位点,确定 Real Time PCR 的扩增区域,然后利用引物设计软件(primer premier 5)设计 Real Time PCR 引物。

1.2.2 基因组片段化与接头连接 组织样品基因组 DNA 按照 QIAGEN 公司的组织基因组 DNA 提取试剂盒步骤进行提取。取正常心脏组织和 CTD 病变组织基因组各 1 $\mu$ g,利用 Tru11 限制性内切酶进行酶切,反应体系为:各基因组 1 $\mu$ g,Tru11 酶 1 $\mu$ L,10 $\times$  buffer 2.5 $\mu$ L,补加灭菌蒸馏水至终体积为 25 $\mu$ L,再加入 10 $\mu$ L 石蜡油防止蒸发,反应条件为 65 $^{\circ}$ C 3~4 小时,利用酶切回收试剂盒对酶切产物进行回收。接头引物序列为:H-24, 5-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAT, H-12, 5-TAA TCC CTC GGA。各取 200 $\mu$ M 的接头引物 100 $\mu$ L,94 $^{\circ}$ C 5 分钟,然后将 2 种引物汇合,自然冷却形成接头。利用 T4 DNA 连接酶,将基因组 DNA 酶切回收产物与制备的接头进行连接,反应体系为:10 $\times$  T4 buffer 5 $\mu$ L,酶切回收产物 10 $\mu$ L,接头 2 $\mu$ L,PEG4000 4 $\mu$ L,T4 连接酶 2 $\mu$ L,补加灭菌蒸馏水至终体积为 50 $\mu$ L,反应条件为 16 $^{\circ}$ C,过夜。

### 1.2.3 GST/MBD 融合蛋白的表达纯化及活性检测

将含有 PET4-GST-MBD 重组质粒的大肠杆菌在 LB-Kan 平板上进行划线,37 $^{\circ}$ C 培养过夜;挑取单克隆,接种于 10ml LB-kan 液体培养基中;次日将培养

液接种于 200ml LB-kan 液体培养基中进行扩大培养;用终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导 3~4 小时以表达 GST/MBD 融合蛋白,分别在 1.5 小时(诱导前)、4 小时(诱导后)取待检测样品,通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯亮蓝染色检测诱导表达结果。200ml 诱导后菌液离心后悬浮在 PBS-T(1% Triton X-100)缓冲液中,此缓冲液中含有终浓度为 1mM 的 PMSF 和 50mg/ml 的溶菌酶,冰上放置 30 分钟,超声破碎细胞,溶解产物经高速离心,上清过 Glutathione Sepharose 4B 层析柱,并用 10 倍柱体积的 PBS 洗去非特异性结合的蛋白,用低盐浓度结合缓冲液洗去大肠杆菌 DNA,最后获得纯化的 GST/MBD 蛋白<sup>[7]</sup>。本实验室前期研究已证实,采用不同的盐离子强度的缓冲液进行洗脱,可以把甲基化的 DNA 和非甲基化的 DNA 分开,实验条件为:100mM NaCl 缓冲液为结合缓冲液,500mM NaCl 缓冲液为洗涤缓冲液,1 000mM NaCl 的缓冲液为洗脱缓冲液<sup>[8]</sup>。

1.2.4 基因组中甲基化 DNA 富集 取 GST/MBD 蛋白层析柱 100 $\mu$ L,离心去上清,用 100 $\mu$ L 500mM NaCl 的洗涤缓冲液平衡 2 次,在含有 100mM NaCl 的结合缓冲液中结合基因组 DNA,放在摇床上 4 $^{\circ}$ C 结合 1 小时。用 500mM NaCl 的缓冲液洗涤,以去除非甲基化 DNA,最后用 1 000mM NaCl 的洗脱缓冲液洗脱并回收甲基化 DNA。

1.2.5 LM-PCR 扩增富集甲基化 DNA 由于富集下来的甲基化 DNA 量较少,不能满足后续实验的要求,因此需要对富集的甲基化 DNA 进行有效的扩增。以富集的甲基化 DNA 为模板,H24 为引物进行 2 轮 LM-PCR 扩增,从而获得足够量的富集甲基化 DNA 的 PCR 产物,用 PCR 产物回收试剂盒进行纯化回收,-20 $^{\circ}$ C 储存以备后续研究。

1.2.6 Real Time PCR 检测样本中 NKX2-5 基因的甲基化状态 采用 SYBR Green Real Time 检测样本 NKX2-5 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态。实验中选取 6 例先天性圆锥动脉干畸形组织样本和 1 例正常心脏组织样本作为研究对象,各取 100ng 富集甲基化 DNA LM-PCR 产物为模板,以 DXZ4 为内参,利用比较定量法,根据 Ct 值与起始模板拷

贝数呈线性关系,分析不同样本中 Ct 值的变化,每个样本重复 3 次,取其平均值。反应体系及反应条件严格按照试剂盒说明书进行。

## 2 结果

2.1 NKX2-5 基因启动子区 CpG 岛的预测及 Real Time PCR 扩增区域的确定 利用 <http://genome.ucsc.edu/> 网站及甲基化分析软件(Methyl Primer Express v1.0)确定 NKX2-5 基因转录起始点上游 5kb 内有 3 个 CpG 岛(图 1),根据 Tru11 酶切片段的大小以及启动子区的确定,本研究选取了 CpG 岛 2 中的 1 段,利用引物设计软件(primer premier 5)设计 Real Time PCR 引物,其上游引物为:GGCTTTGATGAGGGACAGGA,下游引物为 CAAGGTGCGGAGGAAACG,产物长度为 162bp。

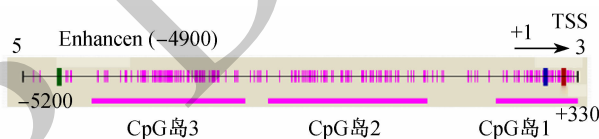


图 1 NKX2-5 基因启动子区 CpG 岛分布

2.2 基因组 DNA 片段化与接头连接分析 Tru11 酶切位点是 TTAA,对基因组 DNA 进行酶切时可以保留绝大部分 CpG 点的完整性,同时片段化基因组的大小集中在 300~700 之间(图 2A),符合实验的预期目标。接头连接的成功与否直接关系到后续实验的成败。以连接产物为模板,H24 为引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析表明接头连接成功(图 2B)。

2.3 GST/MBD 融合蛋白的表达纯化 含有 PET4-GST-MBD 重组质粒的大肠杆菌,用 IPTG 诱导表达 GST/MBD 融合蛋白,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果表明,在菌液的上清中有大量的融合蛋白表达,表达的融合蛋白经过 Glutathione Sepharose 4B 柱纯化,可以得到纯度较高的蛋白,其分子量大小与预期大小一致(图 3)。

2.4 Real Time PCR 检测结果分析 通过 Real Time PCR 检测,与正常心脏组织相比,不同 CTD 病变组织中 NKX2-5 基因的 Ct 值发生不同程度的改变(表 1),其值变化范围在 15~35 之间,属于正

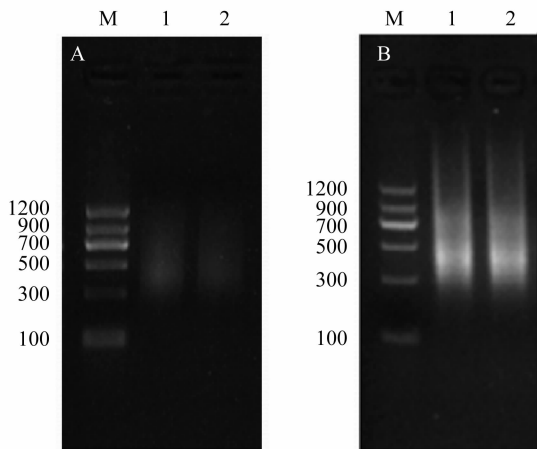


图 2 基因组酶切片段回收和接头连接产物 PCR 图  
M: Marker II; 1: 正常心脏组织基因组; 2: 病变组织基因组。

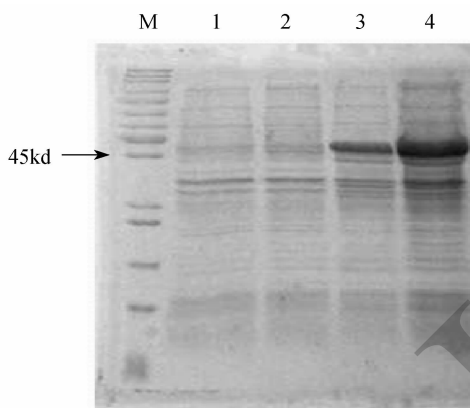


图 3 GST/MBD 融合蛋白的表达和纯化  
M: Marker; 1,2 : 诱导前上清中蛋白;  
3: 诱导后上清中蛋白; 4: 纯化蛋白

常分析范围;根据其扩增曲线(图 4)以及 RQ 柱状图分析(图 5),样本 T8、T11、T27 和 T76 呈现高甲基化,分别是正常心脏组织样本的 3.5、4.2、2.1 和 2.4 倍,T6 和 T19 则无明显变化。

表 1 正常心脏组织和不同病变组织样本中 NKX2-5 基因 Real Time PCR Ct 值

	NKX2-5 Ct 值	DXZ4 Ct 值	$\Delta$ Ct	$\Delta$ Ct SET
Normal	20.196	15.153	5.042	0.017
T6	19.399	14.558	4.841	0.019
T8	17.961	14.715	3.245	0.023
T11	17.940	14.954	2.986	0.022
T19	19.545	14.455	5.090	0.029
T27	18.672	14.712	3.959	0.021
T76	20.131	16.364	3.767	0.067

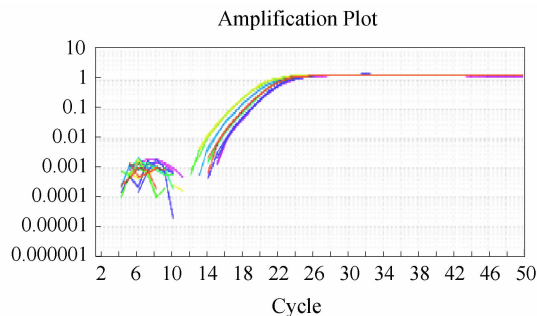


图 4 NKX2-5 基因启动子甲基化 Real Time PCR 扩增曲线图

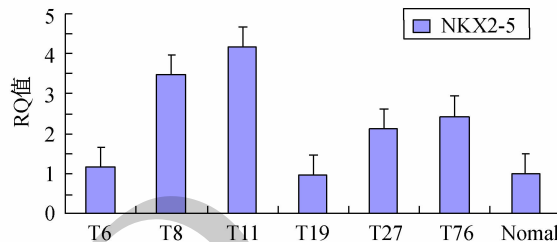


图 5 NKX2-5 基因启动子甲基化 Real Time PCR RQ 检测结果

### 3 讨论

人 NKX2-5 基因定位于染色体 5q35,含 2 个外显子,编码 324 个氨基酸。NKX2-5 基因位于众多对心脏发育有重要作用基因的上游,如 TFGBR3、EDG7、BMP10、CX43、NPPA,以及最近发现的 Etsrp71 和 Chibby 等。应用原位杂交技术发现在 NKX2-5 基因纯合敲除小鼠中,Anp、MeCP2C、Carp 等基因表达受到严重干扰<sup>[9]</sup>。同时,NKX2-5 基因也受 Nodal、Shh/Ihh、Wnt、Notch 和 BMP2 等多个早期胚胎发育相关的信号通路调节<sup>[10]</sup>。

NKX2-5 基因启动子区存在多个具有重要功能的启动子、增强子,以及抑制因子和自动调节因子的结合元件。这些元件在与相应的转录因子结合后,在不同的时间和空间调控 NKX2-5 基因的表达。本研究利用甲基化结合蛋白(MBD)能够与甲基化 DNA 特异性结合的特性,将酶切后片段化的基因组甲基化 DNA 进行有效地富集,同时根据 Real Time PCR 中 Ct 值与起始模板拷贝数呈线性关系这种理论,利用 SYBR Green Real Time PCR 检测 CTD 样本和正常心脏样本中 NKX2-5 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态。结果表明,该方法灵敏度高,准确性强,能够有效地检测出不同样本之间的甲基化状

态。在所测的6例CTD组织样本中,与正常组织样本相比,4例呈现高甲基化,2例甲基化状态改变不明显。由此推断,NKX2-5基因表达异常可能与该基因启动子区甲基化有关。今后我们将扩大样本检测测量,以进一步证实这个重要的现象。

总之,在本研究中,通过Real Time PCR检测,我们发现在CTD病变组织中NKX2-5基因启动子区CpG岛发生了不同程度的甲基化,表明该基因启动子区CpG岛甲基化可能与先心病的发生有关。同时,这种变化有可能对先心病的早期基因诊断有价值,值得进一步探索。

#### 参 考 文 献

- [1] Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002,12: 1890-1900.
- [2] 高燕,黄国英. 先心病病因及流行病学研究进展[J]. 中国循证儿科杂志,2008,3:213-222.
- [3] Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways[J]. J Clin Invest, 1999,104:1567-1573.
- [4] Harvey RP, Lai D, Elliott D, et al. Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol,2002,67:107-114.
- [5] Draus JM, Hauck MA, Goetsch M, et al. Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease[J]. J Med Genet, 2009, 46:115-122.
- [6] Balci MM, Akdemir R. NKX2.5 mutations and congenital heart disease: Is it a marker of cardiac anomalies[J]? Int J Cardiol,2009, [Epub ahead of print].
- [7] 周贝贝,李明辉,于雅晴,等. 一种快速高效的全基因组甲基化 CpG 岛富集方法的建立[J]. 中国生物工程杂志,2008, 5: 78-82.
- [8] 陈雅婷,张进,杜颖颖,等. 利用甲基化 CpG 结合域富集甲基化 DNA[J]. 中国产前诊断杂志(电子版),2008,1 :20-24.
- [9] Nakashima Y, Ono K, Yoshida Y, et al. The search for Nkx2-5-regulated genes using purified embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with Nkx2-5 gene targeting [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009,390:821-826.
- [10] Keren-Politansky A, Keren A, Bengal E. Neural ectoderm-secreted FGF initiates the expression of Nkx2.5 in cardiac progenitors via a p38 MAPK/CREB pathway[J]. Dev Biol, 2009,335: 374-384.

编辑:郑枫芸

(收稿日期:2010-08-23)

读者 · 作者 · 编者

### 本刊对于稿件规范用语的要求(二)

4. 缩略语:文中尽量少用。必须使用时于首次出现处先列出其全称,然后括号注出中文缩略语或英文全称及其缩略语,后两者间用“,”分开。

5. 计量单位:执行国务院1984年2月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》,并以单位符号表示,具体使用参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用(第3版)》一书。首次出现不常用法定计量单位时在括号内注明与旧制单位的换算关系。量的符号一律用斜体字母,如吸光度(旧称光密度)的符号为A。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部