文章编号:1000-5404(2013)03-0245-03

论著

CITED2基因CpG岛甲基化与先天性心脏病的关系

许 敏[1],吴晓云[1],李勇刚[1],邓 兵[2],胡计华[1],田 杰[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:心脏中心[1],儿科学重庆市重点实验室,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地[2])

[摘要] **目的** 研究先天性心脏病患儿CITED2基因启动子区CpG岛的甲基化情况,并探讨其在该病发病中所起的作用。**方法** 收集43例先天性心脏病患儿及2例意外死亡儿童右心耳组织,对CITED2基因进行突变筛查,同时利用生物信息学筛选,分别用亚硫酸氢盐修饰结合测序(BSP)及甲基化特异性PCR(MSP)检测CITED2基因启动子区CpG岛的甲基化情况,并运用实时荧光定量PCR检测CITED2基因mRNA的表达。**结果** 先天性心脏病组启动子区存在4例杂合子突变(均为-341 T>G),此突变对CITED2基因mRNA的表达无影响。其中BSP法成功检测到先天性心脏病组甲基化阳性率为83.3%(10/12),MSP法分析发现甲基化阳性率为84.2%(16/19),同时CITED2基因异常甲基化使其mRNA的表达明显减低($P<0.05$)。**结论** 先天性心脏病中存在CITED2基因CpG岛的异常甲基化,此甲基化下调了CITED2基因mRNA的表达。

[关键词] CITED2;先天性心脏病;甲基化;基因突变
[中图法分类号] R394-33; R394.1; R541.1 [文献标志码] A

Relationship of CpG islands methylation of CITED2 and congenital heart disease

Xu Min[1], Wu Xiaoyun[1], Li Yonggang[1], Deng Bing[2], Hu Jihua[1], Tian Jie[1] ([1]Heart Center, [2]Key Laboratory of Pediatrics of Chongqing, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of methylation of CITED2 promoter in congenital heart disease. **Methods** Myocardial tissues from 43 children with congenital heart disease were collected during surgery in the Department of Cardiothoracic Surgery from March 2011 to March 2012. and the tissue samples of 2 health children were harvested after accidental death. Bisulfite-sequencing PCR (BSP) and methylation-specific PCR (MSP) were used to screening mutation and detect methylation in CITED2 promoter. **Results** Heterozygous mutation (-341T>G) was found in 4 children with congenital heart disease. But this mutation had no effect on mRNA expression of CITED2. Positive rate of CITED2 methylation was 83.3% (10/12) by BSP and 84.2% (16/19) by MSP. Compared with the control group, CITED2 mRNA expression was significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Abnormal methylation of CITED2 promoter (CpG island) is found in congenital heart disease. The abnormal methylation leads to a decrease in mRNA expression of CITED2, which might be involved in the incidence and development of congenital heart disease.

[**Key words**] CITED2; congenital heart diseases; methylation; gene mutation

Supported by the Project for Sci & Tech Research Plan of Yuzhong District Chongqing (2012) and the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-259). Corresponding author: Wu Xiaoyun, E-mail: chongwxy@yahoo.com.cn

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)是最常见的小儿先天性出生缺陷,其致病机制复杂,单纯的遗传变异已不能完全解释,因此,近年来对该病的研究热点逐渐向表观遗传学水平如甲基化、乙酰化方面过渡[1-2]。CITED2(CBP/P300-interacting transactivator with ED-rich 2)在心脏正常发育过程中起重要作用,CITED2缺失及突变小鼠均可出现多种心脏畸形[3]。目前对于CITED2与人类先天性心脏病的关系仅局限于CITED2编码区突变的检测[4-6]。由于启动子区突变或异常甲基化也可影响基因的功能,因此本研究结合甲基化水平对CITED2启动子区进行研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象与试剂

1.1.1 对象 收集2011年3月至2012年3月在本院心胸外科住院并接受外科手术治疗的CHD患儿的右心耳组织43例,其中男性26例,女性17例,法洛四联症4例,房间隔缺损

[基金项目] 重庆市渝中区科技计划项目(2012);重庆市卫生局医学科研计划项目(2009-2-259)
[通信作者] 吴晓云,E-mail: chongwxy@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121101.0922.001.html(2012-11-01)

(ASD)合并室间隔缺损(VSD)12例,ASD 3例,ASD合并肺动脉瓣狭窄2例,肺动脉瓣狭窄1例,右室双出口合并VSD/ASD 7例,完全性房室通路2例,VSD 12例。对照组2例为意外死亡儿童右心耳组织,无CHD。年龄3个月至18岁。本研究获本院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 DNA提取试剂盒(天根公司),EZ DNA Methylation-Gold Kit、Zymo Tag Premix(ZYMO公司),DNA marker(TaKaRa公司),PCP产物纯化和DNA胶回收试剂盒(Promega公司),Trizol(Invitrogen公司),逆转录试剂盒(TaKaRa公司),SsoFastEvaGreen Supermix(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 CITED2基因的生物信息学分析 利用NCBI获取CITED2翻译起始位点(ATG)上游2 000 bp及下游1 007 bp的基因序列,采用Cpgislands、Methprimer、NNPP、Promoter Scan、Signal Scan、TFSEARCH多种生物信息学软件进行CpG岛、核心启动子及转录因子结合位点预测。

1.2.2 CITED2基因突变筛查 提取基因组DNA,设计引物正义链:5′-AAGCACACGTACCCCGGGA-3′,反义链:5′-GGGCTTTGGCCACAGTTAA-3′,PCR扩增并测序。

1.2.3 亚硫酸氢盐修饰结合测序(bisulfite sequencing PCR, BSP) 对基因组DNA进行重亚硫酸盐修饰,对CITED2(−10~−360 bp)区域设计BSP引物,正义链:5′-GGTGGGGTAGATTTAGTTTGAGG-3′,反义链:5′-AACTTTAACCACAATTAATATAAACATTTC-3′,对PCR产物回收纯化,并连接于T载体上,转化至DH5α,筛选阳性克隆送公司测序。

1.2.4 甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP) 对基因组DNA进行甲基化修饰,对CITED2(−1 171~−971 bp)区域设计甲基化引物,正义链:5′-CGCGTGGTGTTATACGGGACG-3′,反义链:5′-ACAAAACCTCCCTCCGAACT-3′;非甲基化引物,正义链:5′-TGTGTGGTGTTATATGGGATG-3′,反义链:5′-ACAAAACCTCCCTCCAAACT-3′,对PCR产物经电泳鉴定甲基化及非甲基化条带。

1.2.5 实时荧光定量PCR检测CITED2 mRNA的表达 分别提取组织RNA,逆转录成cDNA,以β-actin作为内参基因,比较各组CITED2基因的相对表达量,引物序列如下,CITED2正义链:5′-TTCCCTCACTTTCTCCAGTGCTCA-3′,反义链:5′-ATGAAGCGAGATGGCAGTTTGTGC-3′,扩增长度191 bp;β-actin正义链:5′-CATGGGTCAGAAGGATTCCTATGTG-3′,反义链:5′-ATTTTCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3′,扩增长度116 bp。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,2组均数比较行独立样本t检验,多组均数比较行单因素方差分析,率的比较行四格表资料的Fisher确切概率法。

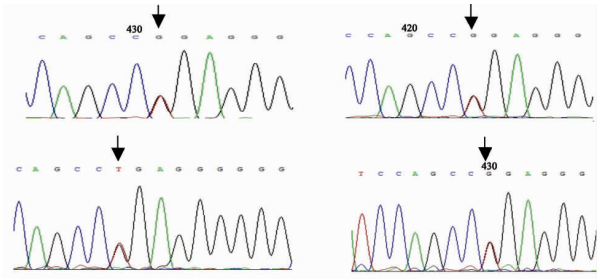
2 结果

2.1 CITED2基因启动子区CpG岛及转录因子结合位点的预测

采用Cpgislands预测到1个长2 727 bp的CpG岛,Methyprimer预测的CpG岛长2 137 bp,两者结果类似。NNPP当分值>0.85时共预测到8个核心启动子序列。Promoter Scan、Signal Scan、TFSEARCH 3种软件预测都存在的转录因子的结合位点为AP-2、SP1,其中AP-2的结合位点中有3个CpG二核苷酸,SP1包含1个CG二核苷酸,且较富集于近端启动子区。

2.2 CITED2基因突变筛查结果

在43例CHD患儿心肌组织中发现4例杂合子突变(ASD合并VSD 1例,ASD合并肺动脉瓣狭窄1例,肺动脉瓣狭窄1例,VSD 1例),均为−341 T>G杂合子突变。见图1。

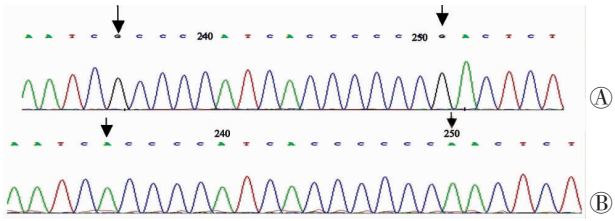


↑:杂合子突变位点

图1 4例CHD患儿心肌组织中CITED2基因PCR产物直接测序结果

2.3 BSP检测

以发生甲基化的C在所有CG位点中所占的比例可得每个样本的甲基化率。在克隆测序成功的12例CHD患儿心肌组织中,有10例发现存在甲基化(法洛四联症2例,ASD合并VSD 4例,右室双出口合并VSD/ASD 2例,VSD 2例),甲基化阳性率为83.3%(10/12),2例对照组织均未见甲基化,甲基化率均为0,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图2。

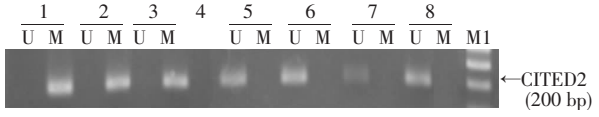


A:CHD组甲基化序列 ↑:甲基化位点;B:对照组相应非甲基化序列 ↑:非甲基化位点

图2 2组CITED2基因互补链的反向克隆测序结果

2.4 MSP检测

在19例CHD患儿心肌组织中发现16例存在甲基化(法洛四联症1例,ASD合并VSD 4例,ASD 2例,右室双出口合并VSD/ASD 2例,完全性房室通路1例,VSD 6例),甲基化阳性率为84.2%(16/19),而2例对照组织中均未见甲基化,甲基化阳性率为0,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图3。



M1:标准,M:甲基化条带;U:非甲基化条带;1:阳性对照;2、3:CHD组甲基化样本;4:空白对照(H_2O);5、6:CHD组非甲基化样本;7、8:对照组

图3 CITED2基因MSP 2%琼脂糖凝胶电泳结果

2.5 实时荧光定量PCR检测2组CITED2基因mRNA的表达

甲基化组(0.38±0.09)与对照组(1.35±0.18)相比,CITED2基因mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),而突变组(1.19±0.09)与对照组相比CITED2基因mRNA表达量并无

明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

甲基化是一种稳定的可遗传的修饰,对基因的表达及细胞的增殖均有重要的作用。CHD的发生是遗传与环境共同作用的结果,有研究表明母体孕期不良生活习惯及药物作用均可通过改变子宫内环境而增加后代患病风险,而某些不良生活习惯可影响体内甲基化过程[7-11],因此提出甲基化与CHD的发生可能存在一定关系,这一观点近年来逐渐被证实。如组蛋白赖氨酸的甲基化与CHD的发生密切相关。Zhu等[12-13]发现VSD患儿与对照组相比存在多个基因甲基化状态改变,NOX5基因CpG岛异常甲基化使其mRNA的表达降低,此改变可影响心脏结构的发育。盛伟等[14]研究表明在CHD动脉圆锥干畸形中存在NKX2.5基因CpG岛高甲基化,表明NKX2.5的甲基化与CHD的发生相关联。

CITED2作为AP-2、PPAR、HIF-1等多种转录因子的共激活因子招募CBP/P300,共同影响心脏结构的发育,同时CITED2可通过Nodal-Pitx2c途径影响心脏左右对称体轴的形成。我们前期研究仅在极少数病例中检测到CHD中存在CITED2编码区的突变[6],可见单纯的遗传变异不能很好地解释CITED2与CHD的关系,因此近年来对CITED2的研究逐渐向遗传与环境共同作用方向过渡,Bentham等[15]发现母体的高脂饮食及CITED2缺失可共同影响Pitx2c的表达,进而影响心脏左右体轴的发育。

本研究对43例CHD患儿进行了CITED2突变筛查,发现4例杂合子突变(均为-341T>G),虽然此突变对CITED2 mRNA的表达无影响,但有研究表明CITED2突变能够抑制VEGF、Pitx2的活性[16],因此,对此突变的作用还有待进一步验证。同时利用生物信息学分析发现CITED2中CpG岛含量丰富,推测可能受甲基化的调控,在我们成功检测的31例样本中,共26例存在CITED2的甲基化,而对照组均未见。同时分析发现CITED2异常甲基化与其mRNA的表达低下有关,分析其原因:在BSP的研究区,预测该区域有22个转录因子的结合位点包含CpG,共13种转录因子,在发生甲基化的14个CpG位点中有8个是转录因子的结合位点,推测CITED2异常甲基化可能通过抑制相应转录因子的结合而表达下调。同时MSP研究区为HIF-1的结合区,CITED2异常甲基化可能会抑制HIF-1的结合而使其表达下降,进而影响心脏的发育,因此,我们提出CITED2甲基化可能是促进人类CHD发生的因素之一。

总之,本研究证实了在CHD中存在CITED2的异常甲基化,且此异常甲基化促使其mRNA的表达低下。这一发现为我们早期诊断及治疗CHD提供了新的靶点,但由于本研究选取的样本例数较少,有一定局限性,下一步将进一步扩大样本量以验证这一发现。

参考文献:

[1] Chowdhury S, Erickson S W, MacLeod S L, *et al*. Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16506.
[2] Stoll C, Roth MP, Dott B, *et al*. Acetylator phenotype and congenital malformations [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1989, 36(2): 151-153.
[3] Bamforth S D, Braganca J, Eloranta J J, *et al*. Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator[J]. Nat Genet, 2001, 29(4): 469-474.
[4] Sperling S, Grimm C H, Dunkel I, *et al*. Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects [J]. Hum Mutat, 2005, 26(6): 575-582.
[5] 彭婷, 李笑天, 王丽. CITED2基因SGJ序列插入突变与先天性心脏病发病[J].复旦学报: 医学版, 2008, 35(4): 574-578.
[6] 杨晓菲, 吴晓云, 李谧, 等. 先天性心脏病患儿Cited2基因突变分析[J]. 中华儿科杂志, 2010, 48(4): 293-296.
[7] Zhou F C, Zhao Q, Liu Y, *et al*. Alteration of gene expression by alcohol exposure at early neurulation[J]. BMC Genomics, 2011(12): 124.
[8] Philibert R A, Plume J M, Gibbons F X, *et al*. The impact of recent alcohol use on genome wide DNA methylation signatures[J]. Front Genet, 2012(3): 54.
[9] Lawrence J, Chen M, Xiong F, *et al*. Foetal nicotine exposure causes PKCε gene repression by promoter methylation in rat hearts[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(1): 89-97.
[10] Chan J, Deng L, Mikael L G, *et al*. Low dietary choline and low dietary riboflavin during pregnancy influence reproductive outcomes and heart development in mice[J]. Am J Clin Nutr, 2010, 91(4): 1035-1043.
[11] Slater-Jefferies J L, Lillycrop K A, Townsend P A, *et al*. Feeding a protein-restricted diet during pregnancy induces altered epigenetic regulation of peroxisomal proliferator-activated receptor-α in the heart of the offspring [J]. J Dev Orig Health Dis, 2011, 2(4): 250-255.
[12] Zhu C, Yu Z B, Chen X H, *et al*. Screening for differential methylation status in fetal myocardial tissue samples with ventricular septal defects by promoter methylation microarrays [J]. Mol Med Report, 2011, 4(1): 137-143.
[13] Zhu C, Yu Z B, Chen X H, *et al*. DNA hypermethylation of the NOX5 gene in fetal ventricular septal defect[J]. Exp Ther Med, 2011, 2(5): 1011-1015.
[14] 盛伟, 王慧君, 马晓静, 等. 先天性心脏病动脉圆锥干畸形NKX2-5基因CpG岛甲基化状态分析[J]. 中国产前诊断杂志: 电子版, 2010, 2(3): 12-16.
[15] Bentham J, Michell A C, Lockstone H, *et al*. Maternal high-fat diet interacts with embryonic Cited2 genotype to reduce Pitx2c expression and enhance penetrance of left-right patterning defects[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(17): 3394-3401.
[16] Li Q, Pan H, Guan L, *et al*. CITED2 mutation links congenital heart defects to dysregulation of the cardiac gene VEGF and PITX2C expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(4): 895-899.

(**收稿**:2012-09-13;**修回**:2012-10-23)
(编辑 王 红)