生殖遗传疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000932

孕期酒精暴露与 CITED2 基因 CpG 岛甲基化关系的研究

刘 山,吴晓云,罗 漫,刘玲娟,田 杰

(重庆医科大学附属儿童医院:心血管内科与小儿心血管病学研究室、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、儿科学重庆市重点实验室,重庆 400014)

【摘 要】**目的**:研究孕期酒精暴露对小鼠胚胎及幼鼠心脏 CBP/P300 反式作用因子 2(CBP/P300-interacting transactivator with ED-rich 2,CITED2)基因表达的影响,探讨孕期酒精暴露与 CITED2 基因启动子区 CpG 岛甲基化水平的关系。**方法**:以 10 μl/(g·d),56%的饮用白酒给 20 只孕鼠[胚胎小鼠发育期(E0.5-E20.5)]连续灌胃作为干预组,生理盐水灌胃 20 只孕鼠作为对照组。取 E14.5、E17.5、新生鼠心脏及生后 7 d 小鼠心脏组织作为标本,qRT-PCR 检测心脏发育相关基因 CITED2、GATA4 结合蛋白 4(GATA binding protein 4,GATA4) mRNA 表达量的变化,MSP 及 BSP 检测 CITED2 基因启动子区 CpG 岛甲基化变化情况。**结果**:孕期酒精暴露致小鼠心脏发育相关基因 GATA4 在 E14.5 及 E17.5[(1.538 ± 0.071)、(1.734 ± 0.101)]较对照组[(0.819 ± 0.176)、(1.115 ± 0.118)]表达水平升高,分别为其对照组 1.88、1.56 倍(P<0.05)。CITED2 的表达在 E14.5、E17.5 及新生小鼠(0.896 ± 0.069,1.336 ± 0.121,0.988 ± 0.108)较对照组(1.246 ± 0.158,1.833 ± 0.086,1.355 ± 0.126)表达水平降低,分别为其对照组 0.72、0.73、0.74 倍(P<0.05),酒精暴露组生后 7 d CITED2 mRNA 表达量(1.276 ± 0.097)较正常组(1.024 ± 0.078)降低,但差异无统计学意义(P>0.05)。**结论**:孕期酒精暴露对 CITED2 基因 mRNA 表达水平起到了负调节作用,说明孕期酒精暴露通过了某种途径对 CITED2 基因表达起到了抑制作用。孕期酒精暴露可能并不是通过改变 CITED2 基因启动子区 CpG 岛甲基化水平来影响 CITED2 基因的表达,从而影响心脏发育。

【关键词】孕期酒精暴露;CBP/P300 反式作用因子 2 基因;甲基化

【中图分类号】R725.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-11-15

Relationship between CpG islands methylation of CITED2 and prenatal alcohol exposure

Liu Shan, Wu Xiaoyun, Luo Man, Liu Lingjuan, Tian Jie

(Department of Cardiology, Laboratory of Children's Cardiovascular Disease, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, the Children's Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To reveal the effect of prenatal alcohol exposure on CBP/P300-interacting transactivator with ED-rich 2 (CITED2) gene expression in mouse embryos and heart, and to investigate the relationship between alcohol exposure during pregnancy and the methylation level of CpG island in the promoter region of CITED2 gene. ***Methods***: Twenty pregnant mice were exposed to a single dose of alcohol (10 μl/g/d, 56% alcohol) by gavage between E0.5-E20.5; another 20 pregnant mice exposed to saline lavage were taken as control group. Embryonic hearts of E14.5, E17.5 fetal mice, newborn mice and postnatal 7 d mice were collected respectively. The mRNA expressions of the heart development-related genes (CITED2, GATA binding protein 4 (GATA4)) were measured by Q-PCR method. CpG islangds methylation of CITED2 promoter was measured. ***Results***: Alcohol exposure increased the expression of GATA4 at E14.5 and E17.5 by 1.88 and 1.56 folds, respectively (P<0.05), decreased the expression of CITED2 at E14.5, E17.5 and newborn by 0.72, 0.73 and 0.74 fold (P<0.05). Alcohol exposure increased the expression of CITED2 on postnatal 7 d, however it showed no statistical difference (P>0.05). ***Conclusion***: Alcohol exposure during pregnancy exerts a negative regulatory effect on CITED2 gene expression, the mechanism of which may not through changing methylation of CpG islands of CITED2 thus affecting cardiac development.

【Key words】prenatal alcohol exposure; CBP/P300-interacting transactivator with ED-rich 2 gene; methylation

作者介绍:刘 山,Email:490293881@qq.com,研究方向:先天性心脏病的发生机制。

通信作者:吴晓云,Email:chongwxy@aliyun.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81270234);重庆市卫生局医学科研计划资助项目(编号:2009-2-259);重庆市渝中区科技计划资助项目(编号:20120216)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.0935.010.html (2016-05-13)

CBP/P300 反式作用因子(CBP/P300-interacting tran-sactivator with ED-rich 2,CITED2),它在心脏正常发育过程中起重要作用。CITED2 基因缺失及突变小鼠可出现多种心脏病变,伴随各种心脏畸形发生[1],表明先天性心脏病与 CITED2 基因的异常有密切关系。目前研究多集中于检测 CITED2 编码区基因突变,而基因功能的改变也可由启动子区 CpG 岛异常甲基化引起。本课题组前期研究即证实了 CITED2 基因启动子区异常甲基化的状态存在于先天性心脏病患儿心脏组织中[2-3]。

酒精作为一种常见的致畸因素,母亲孕期酒精暴露会导致胎儿发生先天性心脏畸形[4]。本课题组前期实验证实,酒精可以导致胚胎心脏组蛋白乙酰化修饰改变,从而引起先天性心脏畸形的发生[5]。DNA 甲基化与组蛋白乙酰化均为表观遗传学改变方式之一,那么,孕期酒精暴露是否能通过影响CITED2 基因启动区 CpG 岛异常甲基化,进而影响 CITED2 的表达,从而导致心脏发育畸形的形成? 另一方面,GATA4 能与多种心脏发育相关基因形成复合体,从而参与调节心脏的正常发育过程。本课题组前期研究中发现,孕期酒精暴露能使 GATA4 mRNA 表达在心脏发育期逐渐升高[5],故本实验选用此基因作为阳性对照基因,通过验证酒精对 GATA4 mRNA 表达量的影响,来观察孕期酒精暴露对 CITED2 mRNA 表达量改变的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 计算胎龄和制备标本 SPF 级成年昆明小鼠(7~8 周,体质量为 20±2) g 共 60 只,重庆医科大学实验动物中心[合格证号:SYXK(渝)2007-0016]提供。以雌雄比例 2:1 进行合笼,18:00 开始,次日 7:00 检查雌鼠阴栓。若发现阴栓则标记为孕 0.5 d(E0.5);若未发现阴栓,则连续合笼 3 d。此后每天记录小鼠体质量,记第 3 天为 E1.5,并将出生后 0.5 d 的小鼠记为新生小鼠(NB),生后 7 d 小鼠记为 P7。将孕鼠随机分为两组,每组 20 只。酒精暴露组于胚胎小鼠发育期(E0.5-E20.5)的孕鼠予 10 μl/g/d,56%的饮用白酒连续灌胃;正常对照组给予 10 μl/g/d 生理盐水灌胃,保证 2 组其他条件如食物、饮水等相同。按照实验设计要求,取孕期为14.5 d、17.5 d 的母鼠各 5 只,采用二氧化碳麻醉后脱颈处死,新生小鼠及生后 7 d 小鼠各 5 只置于冰盒中低温麻痹处死。母鼠剃毛后应用 75%酒精消毒,剪开腹部,取出串珠样子宫,置于装有冰冻 0.01 mol/L PBS 缓冲液的培养皿中,充分清洗。肉眼下分离胚胎小鼠并取出胎鼠心脏,置于预冷的 RNase free 的离心管中,放入冰盒暂时保存。所有标本均于-80 ℃保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 DNA 提取试剂盒(编号 DP304,天根公司,中国);总 RNA 提取试剂盒(编号 DP431,天根公司,中国);EpiTect Fast(编号 59824,QIAGEN 公司,德国);逆转录试剂盒(编号 DRR037S,TaKaRa 公司,日本);SsoFastEva-Green Supermix(编号 1725202,Bio-Rad 公司,美国);透射电子显微镜(日立公司,日本);组织低温匀浆器(型号 Tissuel-yser LT,QIANGEN Hilden 公司,德国);高速低温离心机(型号 Sigma 3k30,Sigma 公司,德国);凝胶图像分析仪(型号 G:BOX,Gene 公司,美国);荧光定量 PCR 仪(型号 bio-rad CFX 96,Bio-rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 病理检测 将孕期酒精暴露组及正常对照组新生小鼠的心脏组织修剪成 2 mm×2 mm×2 mm 的组织块,经过固定、漂洗、脱水、渗透、包埋、切片及染色后,置于透射显微镜下观察及摄片。

1.2.2 qRT-PCR 检测 CITED2 及阳性对照基因 GATA4 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 及对照基因 GATA4 基因的表达量,引物序列如下,CITED2 正义链:5'-GAACGG-CTCGGAATTTGCTC-3',CITED2 反义链 5'-GC CA TTTCC-AGTCCTTCCG-3',扩增长度 179 bp;GATA4 正义链5'-CCCT-CCCGCACGATTTCT-3',GATA4 反义链 5'-AGAGGCCCAA-CTCGCTCAA-3',扩增长度 133 bp。

1.2.3 CITED2 基因的生物学分析 利用 NCBI 获取鼠源 CITED2 基因翻译起始位(AGC)点上游 2 000 bp 的基因序列,采用 methprimer 软件进行 CpG 岛的预测。

1.2.4 亚硫酸氢盐修饰结合测序 (bisulfite sequencing PCR,BSP) 分别提取组织全基因组 DNA,分别对其进行重亚硫酸盐修饰,对 CITED2(-931~-694)区域设计 BSP 引物,正义链 :5' -TTGGATTAAGGGTAATAGTAGAAGTAAGTA -3',反义链:5'-CTTTTCAAAAACAAAAATTAAAAAC-3',对 PCR产物回收纯化,并连接在 T 载体上,转化至 DH5α,筛选阳性克隆送公司测序。

1.2.5 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(-931~-694)区域设计甲基化引物,正义链:5'-TTTTGGTGTAGGAAAAAT-AATTCGT-3',反义链:5'-AAACAAATAAATAACTTAAT-AA-TCGCT-3',扩增长度 297 bp;非甲基化引物,正义链:5'-TTTT-

GGTGTAGGAAAAATAATTCGT-3'，反义链：5'-AAAAAAAC-AAATAAATAACTTAATAATCAC-3'，扩增长度 297 bp，对PCR产物经电泳鉴定甲基化及非甲基化条带。

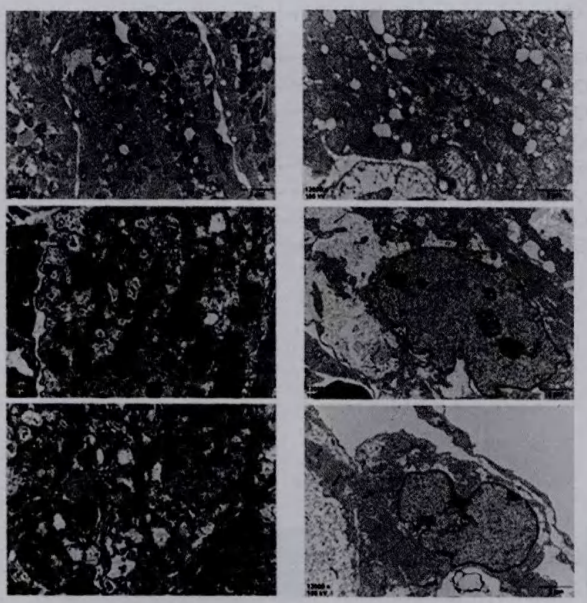
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。所有数据采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）的方式表示，以 Bonferroni 法行多重比较。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 孕期酒精暴露致小鼠心脏发育异常

电子显微镜下，孕期酒精暴露使小鼠心脏较正常对照组可见明显肌丝排列紊乱、溶解，线粒体溶解也更明显（见图1）。



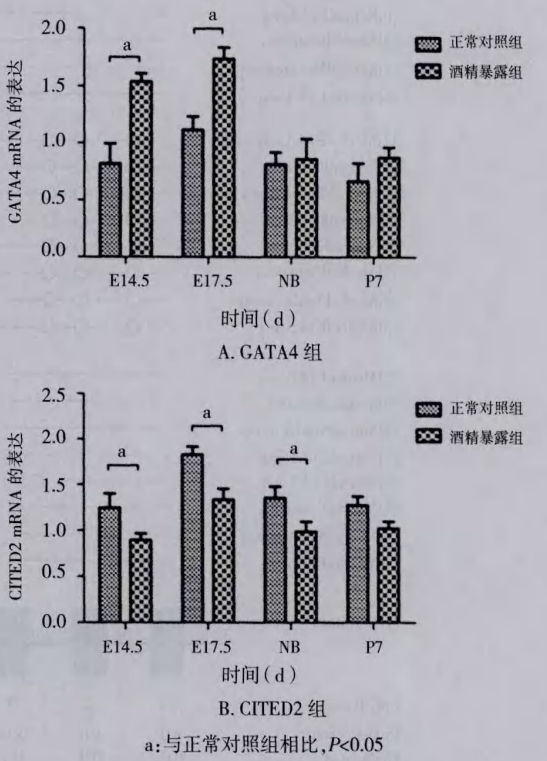
A. 正常对照组　　B. 酒精暴露组

图 1　电子显微镜下新生小鼠组心脏结构图

Fig.1　Cardiac structure of newborn mice under electron microscope

2.2 qRT-PCR 检测 CITED2 基因及 GATA4 基因 mRNA 的表达

孕期酒精暴露致小鼠心脏发育相关基因 GATA4 在E14.5及 E17.5 较对照组表达水平升高，分别为其对照组 1.88、1.56 倍，差异有统计学意义（t=7.58，7.97；P 均<0.05）。新生期及生后 7 d 酒精干预组 GATA4 表达水平较对照组有所增高，但差异无统计学意义（t=0.42、2.26；P 均>0.05）。CITED2 的表达量在E14.5、E17.5 及新生小鼠较对照组表达水平降低，分别为其对照组 0.72、0.73、0.74 倍，差异有统计学意义（t=4.06、6.70、4.42；P 均<0.05）。酒精暴露组生后 7 d CITED2 mRNA 表达量与正常对照组相比，但差异无统计学意义（t=2.04，P>0.05）。（见表 1，图2）。



a：与正常对照组相比，P<0.05

图 2　GATA4 及 CITED2 mRNA 表达水平

Fig.2　Expression of GATA4 and CITED2 mRNA

表 1　GATA4 及 CITED2 mRNA 表达水平（n=4）

Tab.1　Expression of GATA4 and CITED2 mRNA（n=4）

胎龄	GATA4 mRNA 表达水平		CITED2 mRNA 表达水平	
	正常对照组	酒精暴露组	正常对照组	酒精暴露组
E14.5	0.819 ± 0.176	1.538 ± 0.071[a]	1.246 ± 0.158	0.896 ± 0.069[a]
E17.5	1.115 ± 0.118	1.734 ± 0.101[a]	1.833 ± 0.086	1.336 ± 0.121[a]
新生小鼠	0.815 ± 0.104	0.859 ± 0.178	1.355 ± 0.126	0.988 ± 0.108[a]
生后 7 d 小鼠	0.667 ± 0.159	0.873 ± 0.089	1.276 ± 0.097	1.024 ± 0.078

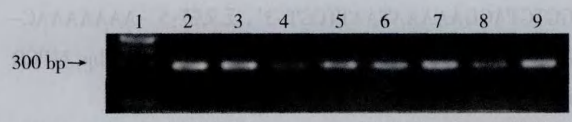
注：a，P<0.05

2.3　MSP 检验

通过对 PCR 产物电泳分析后，在酒精灌胃组及正常对照组中均只发现非甲基化条带，未见明显甲基化条带(见图3)。

2.4　BSP 检验

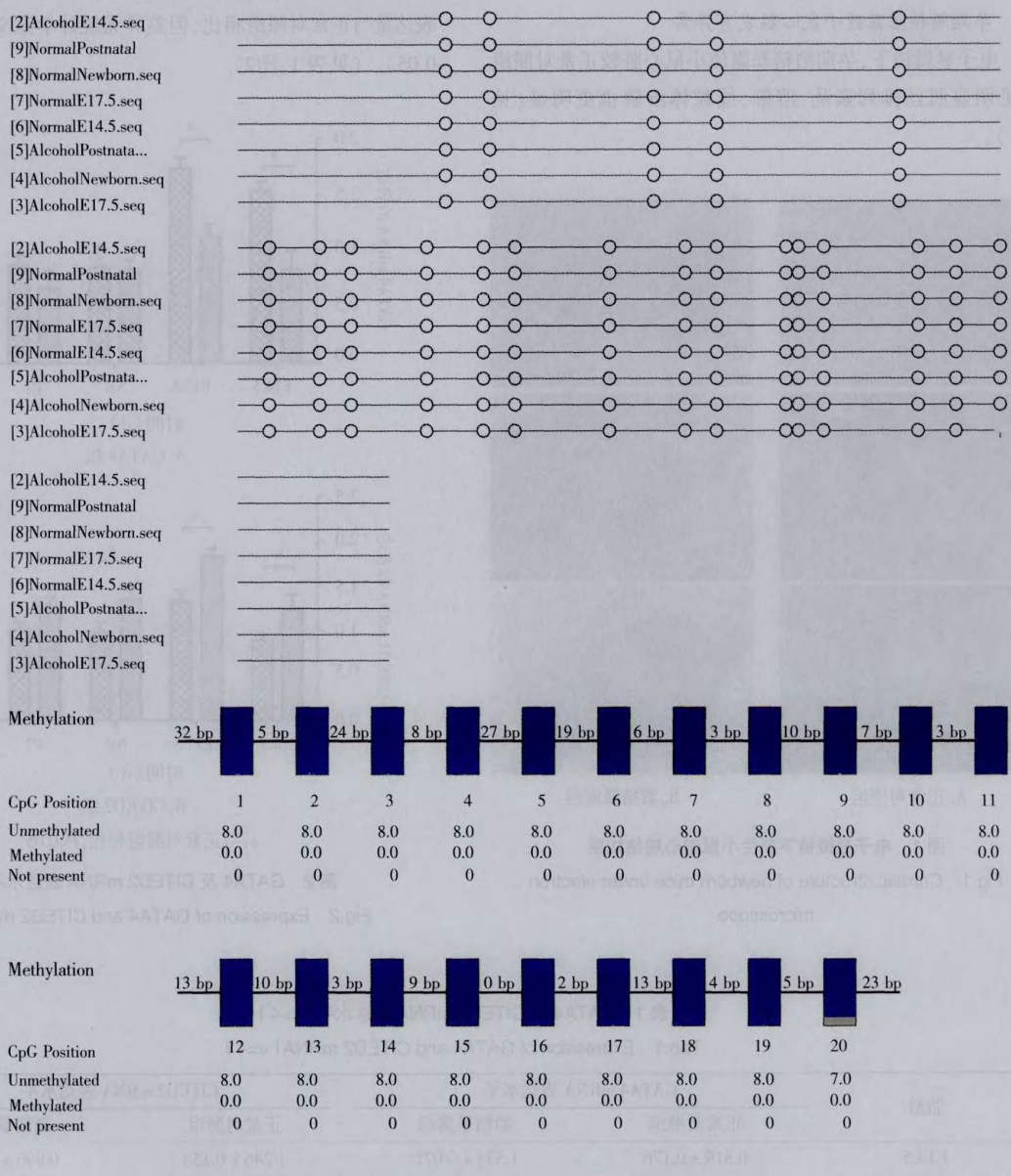
对 DNA 片段分析后，以发生甲基化的 C 在所有 CG 位点中所占比例可得每个样本的甲基化率。成功筛选出所需克隆片段后，对每个片段行 10 克隆子片段测序，保证所得结果准确性。采用 BiQ_Analyzer 软件对测序结果进行分析，发现在酒精灌胃组 4 个时间点及正常对照组 4 个时间点中，均未检测到异常 CITED2 基因异常甲基化(见图 4)。



1：DNA marker；2：酒精灌胃组 E14.5；3：正常组 E14.5；4：酒精灌胃组 E17.5；5：正常组 E17.5；6：酒精灌胃组新生小鼠；7：正常组新生小鼠；8：酒精灌胃组生后 7 d 小鼠；9：正常组生后 7 d 小鼠；2~9 均为非甲基化条带

图 3　CITED2 基因 MSP 2%琼脂凝胶电泳结果

Fig.3　CITED2 gene 2% agarose gel electrophoresis by MSP



Normal：正常对照组；Alcohol：酒精暴露组

图 4　CITED2 基因启动子区 CpG 岛甲基化水平分析

Fig.4　Analysis of CpG islangds of promoter in CITED2 gene

3 讨 论

心脏正常发育不仅需要心脏发育相关基因在时间顺序及空间构架上的精确表达，同时还需要相对稳定良好发育相关的环境，它是一个十分复杂而又十分精细的发育过程。遗传和环境因素构成了心脏发育的内因和外因，它们不仅各自发挥作用，更能协同合作共同作用于心脏发育。而作为连接遗传和环境两方面因素的纽带——表观遗传，广泛参与到遗传和环境因素对心脏发育的影响过程中。表观遗传是环境因素对遗传因素起作用的作用方式，环境因素可以通过表观遗传影响基因遗传信息的表达状态，遗传信息又会通过表观遗传的改变反映环境因素的作用，从而引起生物学的改变[6-10]。酒精是一种常见的致畸因子，孕期酒精暴露可以致子代胎儿发育出现异常，产生一系列跟酒精相关的疾病，而这些疾病中最严重、最常见的疾病即为胎儿酒精综合征，其主要的表现就是子代胎儿在胚胎发育期及出生后的生长发育迟缓与异常。典型的临床表现有显著心脏畸形和颅脑颜面畸形，同时伴有一系列持续性精神异常以及与大脑功能相关的认知障碍等[3]。另有报道揭示先天性心脏畸形伴行于胎儿酒精综合征患儿占所有患有胎儿酒精综合征的患儿的 29%~50%[11]，本课题组前期研究中证实了酒精可引起小鼠心脏发育异常，在孕期酒精暴露组中E17.5的小鼠心脏 HE 染色片中，可见与正常小鼠心脏结构不同的病理性肥厚、心肌缺血等一系列异常改变，其发生机制可能与酒精导致组蛋白乙酰化失衡及相关心脏发育基因表达异常有关[5,12-13]。

CITED2 作为心脏发育相关基因中的重要一员，它的功能的正常发挥与整个心脏的正常发育息息相关。国内外均有检测 CITED2 编码区突变的报道，认为先天性心脏病致病机制之一即可能是 CITED2 基因突变，然而 CITED2 编码区的突变也仅仅在非常少的先天性心脏病病例中出现，由此可以知道单方面基因突变的机制并不能完美的解释先天性心脏病与 CITED2 的相关关系。基因与环境的共同作用可能是原因之一，其作用机制可能为单纯的遗传因素做出补充。Bamforth 等[14]和 Bentham 等[15]发现母体 CITED2 基因缺失合并有高脂饮食可以通过抑制 Pitx2c 的表达而增加心脏体轴发育异常的畸形率，首次提出 CITED2 基因缺失及环境因素改变的共同作用与先天性心脏病的发生有密切相关性。Leung等[16]则首次对 CITED2 启动子及编码区的序列进行了测序等分析，发现 CITED2 不仅包含有丰富的CpG 岛，于启动子及整个编码区有覆盖，并发现有多个转录因子的某些特定的结合位点在这些 CpG 岛内，并能保证和发挥各自相应的功能，如HRE 结合区即位于-1 135 bp—-1 170 bp 位上含有 3 个连续的 A/GCGTG，这些序列能与转录因子 HIF-1 稳定结合，故此命名。Leung 等[16]检测及验证了基因核心启动子序列的活性，并发现了 CITED2 启动子区的活性与其近端启动子区附近两个核心启动子有关，同时还指出 CITED2 富含丰富的 CpG 岛可能跟甲基化等表观遗传调控有关。

本课题组在前期研究中发现了 31 例先天性心脏病患儿的心脏组织中存在 26 例 CITED2 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化的现象，而在正常对照组中未发现有此种变化[2-3]。相关研究也发现 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine，S-SAM)及二甲基甘氨酸(N，N-dimethyl glycine，DMG)在部分先天性心脏病患儿中存在较高的水平[17]，S-SAM 及 DMG作为参与体内一碳单位循环的重要中间产物，体内的甲基化水平可通过它们反映出来。研究表明先天性心脏病的发生与多种心脏发育相关基因如 GATA4、NKX2.5、NOX5 等基因的异常甲基化改变有关。如 GATA4 基因 CpG 岛的甲基化水平在法洛四联症的心肌组织远高于正常组织。进一步研究发现 PRC 能使 GATA4 发生异常甲基化，从而无法与乙酰化的P300 正常结合，导致基因的功能的改变，以至于 GATA4 活性降低，表达水平也就相应降低；进一步实验发现通过施加干预措施，采用甲基化酶抑制剂 5-Aza 抑制 GATA4 的异常甲基化后，可使GATA4的表达相应增高[18-20]。

本研究验证了孕期酒精暴露对心脏正常结构的影响，并证实了其对发育相关基因 GATA4 mRNA 表达水平的调控作用[5]。同时发现了其对 CITED2 基因 mRNA 表达水平也起到了负调节作用，表明孕期酒精暴露通过了某种途径对 CITED2 基因表达起到了抑制作用。利用生物信息学分析发现 CITED2 基因中 CPG 岛含量丰富，但在随后的 MSP 及 BSP 检测

中并未发现孕期酒精暴露组与正常对照组相互之间在各个特定心脏发育阶段存在明显不同，两组均未发现明显的 DNA 异常甲基化。说明了孕期酒精暴露可能并不是通过对 CITED2 基因启动子区异常甲基化修饰来影响 CITED2 基因的表达，从而影响心脏发育。

本研究虽然未能发现孕期酒精暴露与心脏发育相关基因 CITED2 CpG 岛异常甲基化的相关关系，但并不能说明酒精与 CITED2 基因 mRNA 异常表达无关，酒精可能通过基因突变或相应组蛋白乙酰化等其他途径来影响 CITED2 基因 mRNA 表达水平。由于本研究实验过程中，受限于各方面条件，故选取特定 DNA 片段（CITED2 -931~-694 区域），此片段经由前期实验所得，为 CITED2 基因的 CpG 岛且能设计出对应相关甲基化 PCR 引物，有一定局限性，下一步可进一步扩大检测范围以验证这一发现。

参 考 文 献

[1] Bamforth SD, Braganca J, Eloranta JJ, 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.

[2] Xu M, Wu X, Li Y, et al. CITED2 mutation and methylation in children with congenital heart disease[J]. J Biomed Sci, 2014(21): 7.

[3] 徐 敏，吴晓云，李勇刚，等. CITED2 基因 CpG 岛甲基化与先天性心脏病关系的研究[J]. 第三军医大学学报，2013，3(3)：245-247.

[4] Paintner A, Williams AD, Burd L. Fetal alcohol spectrum disorders--implications for child neurology, part 1: prenatal exposure and dosimetry[J]. J Child Neurol, 2012, 27(2): 258-263.

[5] 潘 博，孙慧超，吕铁伟，等. 酒精致小鼠胚胎心脏组蛋白 H3K9 高乙酰化失衡及其表突变[J]. 临床心血管杂志，2013，29(5)：395-398.

[6] Chang CP, Bruneau BG. Epigenetics and cardiovascular development[J]. Annu Rev Physiol, 2012(74): 41-68.

[7] Philibert RA, Plume JM, Gibbons FX, et al. The impact of recent alcohol use on genome wide DNA methylation signatures[J]. Front Genet, 2012(3): 54-61.

[8] Lawrence J, Chen M, Xiong F, et al. Foetal nicotine exposure causes PKC gene repression by promoter methylation in rat hearts[J]. Cardiovascular Research, 2011, 89(1): 89-97.

[9] Chan J, Deng L, Mikael LG, 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.

[10] Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA, Townsend PA, 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.

[11] Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome[J]. N Engl J Med, 1978, 298(19): 1063-1067.

[12] 王琳轶，钟立霖，田 杰，等. 姜黄素干预乙醇对心肌祖细胞 H3K9 的高乙酰化失衡及心脏发育相关基因表达异常[J]. 临床心血管病杂志，2011，27(4)：303-306.

[13] 李 莉，朱 静，田 杰，等. 抑制组蛋白乙酰化酶活性对心肌微环境中间充质干细胞向心肌细胞分化的影响[J]. 中华医学遗传学杂志，2008，25(2)：159-163.

[14] Bamforth SD, Bragança J, Farthing CR, et al. Cited2 controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway [J]. Nat Gene, 2004, 36(11): 1189-1196.

[15] Bentham J, Michell AC, 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] Leung MK, Jones T, Michels CL, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human CITED2 gene encoding p35srj/Mrg1 [J]. Genomics, 1999, 61(3): 307-313.

[17] Alsayed R, Al Quobaili F, Srour S, et al. Elevated dimethylglycine in blood of children with congenital heart defects and their mothers[J]. Metabolism, 2013, 62(8): 1074-1080.

[18] Sheng W, Wang H, Ma X, et al. LINE-1 methylation status and its association with tetralogy of fallot in infants[J]. BMC Med Genomics, 2012(5): 20.

[19] He A, Shen X, Ma Q, et al. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity[J]. Genes Dev, 2012, 26(1): 37-42.

[20] Zhang J, Huang C, Wu P, et al. Differentiation induction of cardiac c-kit positive cells from rat heart into sinus node-like cells by 5-azacytidine[J]. Tissue Cell, 2011, 43(2): 67-74.

（责任编辑：张辉洁）