

COL6A2 基因 3'-UTR 区域功能单核苷酸多态性位点 rs1044598 参与 miR-4252 调节中国汉族人群先天性房间隔缺损

杨骏艺¹, 许晶^{1*}, 徐晓晗¹, 王屹丰², 林苑², 王晓伟^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院胸心外科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨 COL6A2 基因 3'非翻译区(3'-UTR)单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点对先天性房间隔缺损(congenital atrial septal defect, ASD)发病风险的影响及其可能的作用机制。方法:搜索 PubMed 及 Hapmap 数据库获得 COL6A2 基因 3'-UTR 区域中国汉族人群最小等位基因频率>0.05 的 SNP 位点, 随后通过 miRNA-SNP 功能网站预测 SNP 位点的功能情况并与本课题组前期 ASD 全基因组关联研究数据库比对, 研究 SNP 位点与 ASD 的发病关联, 最后对可能的功能位点进行功能学研究。结果:rs1044598 位点 AA 基因型较野生 TT 基因型显著减少了 36% 的患病风险。HEK293T 细胞、H9C2 细胞以及 SD 乳鼠原代心肌细胞荧光素酶报告基因转染实验证实, miR-4252 与 COL6A2 基因 rs1044598 不同基因型表达质粒共转染后, 荧光强度在 3 个细胞系中均有显著差异($P < 0.05$)。结论:COL6A2 基因 rs1044598 位点的变异可能与 ASD 的发病风险相关。miR-4252 可通过与 COL6A2 的 3'-UTR 区域发生有效结合而下调基因的表达, 而 rs1044598 位点的变异参与这一机制并减少 ASD 的发生。

[关键词] 先天性房间隔缺损; VI 型胶原酶基因 $\alpha 2$ 亚型; 单核苷酸多态性; 非编码单链 RNA; 全基因组关联研究

[中图分类号] R541.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)09-1057-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160907

The mechanism of miR-4252 regulating pathogenesis of congenital atrial septal defect with SNP (rs1044598) in 3'-UTR of COL6A2 in Han Chinese populations

Yang Junyi¹, Xu Jing^{1*}, Xu Xiaohan¹, Wang Yifeng², Lin Yuan², Wang Xiaowei^{1*}

(¹Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029;

²School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association and potential mechanism between single nucleotide polymorphism (SNP) in 3' untranslated region (3'-UTR) of COL6A2 and the risk of congenital atrial septal defect (ASD). **Methods:** SNPs in 3'-UTR of COL6A2 were searched in PubMed and Hapmap database for minimum allele frequency (MAF) > 0.05 in Han Chinese population. Then the potential functional SNPs were predicted in website of miRNA-SNP. Meanwhile, the association between SNPs and the risk of ASD was checked in our previous Genome-wide association study (GWAS) database of congenital septation defects. **Results:** Rs1044598 mutant genotype AA decreased the risk of ASD by 36% compared with wild genotype TT. The luciferase reporter assay further confirmed that the significant differences were detected in cotransfected plasmid (rs1044598) with miR-4252 in HEK293T, H9C2 and cardiac cells from newborn SD rats cell lines (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Rs1044598 may be a new independent susceptibility locus of ASD. MiR-4252 down-regulates COL6A2 expression by binding to 3'-UTR of COL6A2, and rs1044598 could influence the procedure and decrease the risk of ASD.

[Key words] congenital atrial septal defect; COL6A2; single nucleotide polymorphism; microRNA; GWAS

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(09): 1057-1062]

[基金项目] 国家自然科学基金(81300128, 81573234); 江苏省自然科学基金(BK20131025); 教育部博士点基金(20123234120015); 教育部留学回国人员基金(FD12); 新疆科技厅科技援疆专项(201391121)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jingxu@njmu.edu.cn; wangxiaowei@njmu.edu.cn

先天性房间隔缺损 (congenital atrial septal defect, ASD) 是新生儿中发病率第3的先天性心脏病, 在各类先天性心脏病中所占比例约为30%^[1]。ASD发病机制复杂, 调控心内膜增殖与发育的基因表达异常被认为是可能的主要机制^[2-3]。VI型胶原酶基因 $\alpha 2$ 亚型 (collagen VI- $\alpha 2$, COL6A2), 位于21号染色体长臂2区2带3亚带^[4], 与VI型胶原酶 (collagen VI, COL6) 的另两种基因亚型 COL6A1 和 COL6A3 共同辅助编码合成 COL6 蛋白。Gittenberger 等^[5] 在实验中发现, 先天性房室间隔缺损 (atrioventricular septal defect, AVSD) 患者心肌组织中的 COL6A2 基因表达水平较正常人高。在针对全美先天缺陷与发展性障碍的研究中发现^[6-8], COL6 蛋白以及它的3个编码基因, 在 ASD 和 AVSD 患者的心肌组织中均表现为不同程度的过表达。COL6A2 的过表达可同时出现于 ASD 和 AVSD 患者中, 而 COL6A1 和 COL6A3 的过表达只出现在 AVSD 患者中, 但具体机制尚不明确。

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 对 ASD 发病机制的影响是目前的研究热点。Draus^[9] 和 Cordell 等^[10] 在对欧洲人群 ASD 患者的研究中发现, 突触融合蛋白18 (syntaxin-18, STX18) 基因上 rs870142、rs16835979 和 rs6824295 位点的突变基因型可能增加 ASD 的发病风险。中国人群的相关研究中, Yu^[11] 和 Zhao 等^[12] 通过对 ASD 患者的外周血样本进行 DNA 检测发现心脏特异性同源盒基因 (NK2 transcription factor related-locus 5, NKX 2.5) 上 rs2277923 位点和 STX18 基因上 rs16835979 位点与 ASD 的发病风险相关, 其突变基因型显著增加 ASD 的发病风险。此外, T-box 转录因子15 (T-box transcription factor-15, TBX15) 基因上 rs2474937 位点和核转录激活蛋白家族 (mastermind like-3, MAML3) 基因上 rs1531070 位点的突变基因型同样可显著增加 ASD 的发病风险^[13]。

microRNA (miRNA) 是一类序列较短, 有着高度保守性的非编码 RNA。miRNA 具有延迟转录活动的特性, 对基因的表达起负向调控作用。研究认为 miRNA 是基因转录或表达的指挥官^[14], 成熟的 miRNA 可以与靶向基因的 3'-UTR 区域结合, 抑制基因的转录活性, 从而下调基因的表达。主要通过 mRNA 的降解、转录本的脱腺苷化作用、翻译活动受阻或 P 小体中的 mRNA 多价螯合来实现^[15-16]。研究显示, 基因 3'-UTR 区域 SNP 可以通过改变 miRNA 与基因的结合, 调控基因的表达水平, 从而影响疾病

的发生^[17]。本研究拟探索 ASD 发生相关基因 COL6A2 3'-UTR 区域 SNP 是否通过影响 miRNA 与之结合而在 ASD 的发生中发挥作用。

1 材料和方法

1.1 材料

报告基因载体 pGL4.26 (南京新科元生物公司), 载体纯化试剂盒 (Qiagen 公司, 美国), 限制性内切酶和 DNA 聚合酶、实时定量 PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶 (南京锐博生物公司), DNA 纯化试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), PCR 引物序列 (南京金斯瑞生物科技公司)、HEK293T 细胞、H9C2 细胞 (ATCC 公司, 美国); 脂质体 Lipofectamin 2000TM (Invitrogen 公司, 美国), DMEM、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 胰酶、EDTA (Sigma 公司, 美国); miRNA 模拟物 (南京锐博生物公司); 其他试剂购自南京凯基生物公司。

1.2 方法

1.2.1 GWAS^[13]研究对象

病例组来源于2006年3月—2009年3月南京医科大学第一附属医院和南京市儿童医院就诊入院的散发性汉族 ASD 患者 945 例。对照组 1 246 例来自于同一时期上述医院就诊的患者, 排除先天性疾病、心脏疾病、家族性心脏病史。病例诊断标准: 经心脏超声、心脏导管或手术确诊的 ASD 患者。病例排除标准: 患者有染色体异常, 发育相关综合征, 先天性心脏病家族史, 母体怀孕时暴露于致畸环境或有致畸药物史。所有研究对象均签署知情同意书, 完成统一的流行病学调查并提供 2 mL 外周血样本。

1.2.2 质量控制

研究个体的质量控制: ①去除基因分型成功率 < 95% 的个体; ②通过 X 染色体上位点的分型信息判别样本性别, 对与基线流行病学调查结果不一致者进行电话回访核实性别, 剔除性别确实不一致的个体; ③对所有样本都进行 pairwise-identity-by-state 分析, 比较个体间的两两相似度, 以二级亲属及以上亲缘关系为标准 (PI_HAT > 0.25), 剔除有亲缘关系的个体。

SNP 位点的质量控制, 剔除: ①非常染色体上的 SNP 位点; ②基因分型检出率 < 95% 的 SNP 位点; ③最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) < 0.05 的 SNP 位点; ④对照组 MAF > 0.05 的 SNP 位点; ⑤对照组中基因分型不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律的 SNP 位点。

1.2.3 SNP 位点初步筛选

从 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 和 Hapmap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap27_B36/) 中查询 COL6A2 3'-UTR 区域中国汉族人群 MAF>0.05 的 SNP 位点。共筛选出 5 个符合要求的 SNP 位点:rs559、rs1044598、rs11554666、rs7717、rs73382475。

1.2.4 miRNA 及 SNP 功能筛选

利用 miRNASNP v2.0 功能预测网站 (www.bioguo.org/miRNASNP/), 对上述 5 个 SNP 位点分别进行功能预测,搜索可能作用的 miRNA 及结合的最小自由活化能 (minimum free energy, MFE), 根据文献采用 $\Delta MFE \geq 4 \text{ kcal/mol}^{[17]}$ 作为选取拟研究 miRNA 的标准。经查询,rs559 可能影响 miR-338-3p 与 COL6A2 基因 3'-UTR 区域的结合 ($\Delta MFE = 17.2 \text{ kcal/mol}$), 而 rs1044598 可能影响 miR-4252 与 COL6A2 基因 3'-UTR 区域的结合 ($\Delta MFE = 22.4 \text{ kcal/mol}$)。

1.2.5 GWAS 数据库中 SNP 位点关联分析

在前期先天性心脏间隔缺损 GWAS 数据库搜索 rs559、rs1044598 与 ASD 的发病关联,并选出可能有相关性的位点进行功能实验研究。经查询,仅有 rs559 和 rs1044598 两个位点可能与 ASD 的发病风险相关。

1.2.6 引物设计与合成

通过 NCBI 数据库中人 COL6A2 基因序列 (NM_058174), 设计包含 rs559、rs1044598 的 3'-UTR 区克隆引物 rs559-F1/rs559-R1、rs1044598-F1/rs1044598-R2(表 1),上下游引物分别携带 *Not I* 和 *Xho I* 酶切位点。

1.2.7 质粒构建与 miRNA 合成

分别用 *Xho I* 和 *Not I* 切割载体 pGL4.26,回收胶后,将 pGL4.26-COL6A2-rs559-T/C、pGL4.26-COL6A2-rs1044598-T/A 片段和 pGL4.26 载体连接,得到重组载体 pGL4.26-COL6A2-rs559T/C(Prs559T/C)、pGL4.26-COL6A2-rs1044598T/A(Prs1044598T/A)。

参照 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中 miR-338-3p (MI MAT0000763) 和 miR-4252 (MI-

MAT0016886) 的序列,设计并合成 miR-338-3p 和 miR-4252 模拟物 (mimic) 及无关序列片段 Negative control mimic (NC)。模拟物及 NC 的合成由南京锐博生物技术有限公司完成。

1.2.8 细胞系的培养

HEK293T、H9C2 和 SD 乳鼠原代心肌细胞培养均用含 10% 胎牛血清及含终浓度为 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂、相对湿度 90% 的细胞培养箱中培养。

1.2.9 荧光素酶转染报告基因实验

将 HEK293T 细胞、H9C2 细胞、SD 乳鼠原代心肌细胞接种至 12 孔板 (2.5×10⁵ 个/孔) 中,待汇合度达 50%~70% 时,将 Prs1044598T 或 Prs1044598A 与 miR-4252 mimic 和 NC、Prs559T 或 Prs559C 与 miR-338-3p mimic 和 NC,分别转染 HEK293T、H9C2、SD 乳鼠原代心肌细胞。24 h 后,收集细胞裂解液,按照双荧光素酶检测试剂盒说明书操作,采用化学单管检测仪分别测定各组的萤火虫和 (内参照) 海肾荧光素酶活性,分析比较不同等位基因对 miRNA 和 3'-UTR 区序列结合的影响。上述实验均独立重复 3 次。实验共分 4 组:1 组:野生型质粒+NC mimic;2 组:突变型质粒+NC mimic;3 组:野生型质粒+miRNA mimic;4 组:突变型质粒+miRNA mimic。

1.3 统计学方法

使用 SPSS18.0 软件分析,各组间均数比较采用非配对 *t* 检验;采用 Logistic 回归分析计算比值比 (OR) 及 95% 可信区间 (confidence interval, CI) 来研究不同 SNP 基因型与 ASD 发病风险的关联。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rs559 和 rs1044598 的不同基因型与 ASD 发病风险分析

在 GWAS 数据库中,搜索 rs559、rs1044598 基因变异与 ASD 发病风险的相关信息。结果显示,rs1044598 的不同基因型对于 ASD 发病风险有显著相关性。其中,与携带野生基因型 TT 的人群相比,携带 AA 基因型的人群,其 ASD 的发病风险可降低 36%

表 1 引物序列和碱基长度
Table 1 Primer sequences and product size

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
rs559-F1	ACGTTGGATGTACAGTCCCTCCAGGGGCTC	30
rs559-R1	ACGTTGGATGAAGATGCAGCCGCAGCAAG	29
rs1044598-F1	ACGTTGGATGATCTTCCAGTCTCTCCTCCG	30
rs1044598-R2	ACGTTGGATGGGGCCTTAAATTCATGACC	30

(OR:0.64, 95%CI:0.44~0.93, $P=0.026$)。而 rs559 与 ASD 的发病风险仅可能相关,调整前(OR:1.53, 95%CI:1.06~2.20, $P=0.022$), 依据年龄、性别因素调整后(OR:1.38, 95%CI:0.95~2.02, $P=0.093$, 表 2)。

2.2 荧光素酶报告基因实验结果

转染后荧光素酶报告基因检测结果显示(图 1~3), rs559 与 miR-338-3p 共转染在 3 种细胞系中

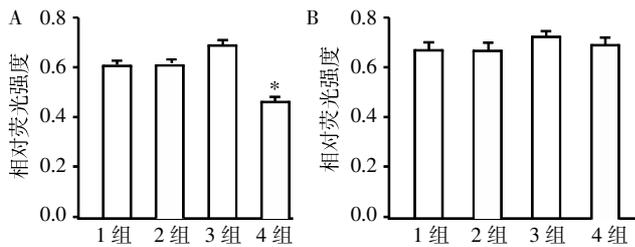
差异均无统计学意义(HEK293T, $P=0.158$; H9C2, $P=0.342$; SD 乳鼠原代心肌细胞, $P=0.054$)。而 rs1044598 与 miR-4252 结合功能在 3 种细胞系中一致:与突变型质粒+NC mimic 处理组相比,突变型质粒+miRNA mimic 处理组的相对荧光活性明显降低,且差异有统计学意义(HEK293T 细胞, $P=0.013$; H9C2 细胞, $P=0.012$; SD 乳鼠原代心肌细胞, $P=0.009$)。

表 2 rs559 和 rs1044598 基因分型 Logistic 回归分析结果

Table 2 Logistic regression analysis for rs559 and rs1044598 genotyping

SNP	等位基因型	ASD 组(n=334)	对照组(n=1 246)	OR ^c	95%CI ^c	P 值 ^c	OR ^d	95%CI ^d	P 值 ^d
rs559	TT ^a	126	533		1.00			1.00	
	TC	153	561	1.15	(0.89~1.50)	0.288	1.14	(0.86~1.49)	0.364
	CC ^b	55	152	1.53	(1.06~2.20)	0.022	1.38	(0.95~2.02)	0.093
rs1044598	TT ^a	120	381		1.00			1.00	
	TA	162	590	0.87	(0.67~1.14)	0.317	0.91	(0.69~1.20)	0.019
	AA ^b	52	275	0.60	(0.42~0.86)	0.006	0.64	(0.44~0.93)	0.026

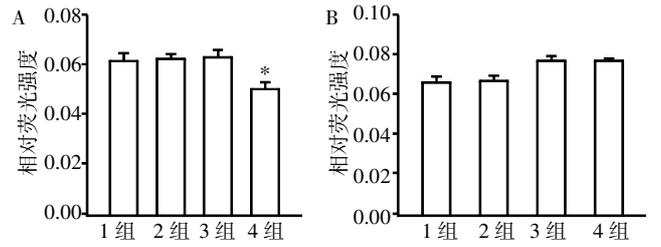
a:野生型等位基因;b:突变型等位基因;c:原始 OR、95% CI 及 P 值;d:依据年龄、性别调整后 OR、95%CI 及 P 值。



A:miR-4252 与 Prs1044598 (T>A) 共转染;B:miR-338-3p 与 Prs559(T>C)共转染;与 2 组相比, * $P=0.012$ 。

图 1 H9C2 细胞中荧光素酶报告基因结果

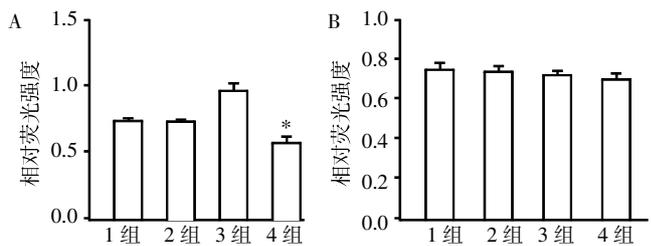
Figure 1 Results of luciferase reporter assay in H9C2 cells



A:miR-4252 与 Prs1044598 (T>A) 共转染;B:miR-338-3p 与 Prs559(T>C)共转染;与 2 组相比, * $P=0.009$ 。

图 3 SD 乳鼠原代心肌细胞中荧光素酶报告基因结果

Figure 3 Results of luciferase reporter assay in primary myocardial cells of SD rat



A:miR-4252 与 Prs1044598(T>A)共转染;B:miR-338-3p 与 Prs559 (T>C)共转染;与 2 组相比, * $P=0.013$ 。

图 2 HEK293T 细胞中荧光素酶报告基因结果

Figure 2 Results of luciferase reporter assay in HEK293T cells

3 讨论

ASD 发病与原始心房间隔的发育、融合、吸收异常紧密相关,基因的表达异常是重要原因。例如 GATA-4、NKX2.5 等基因,可以调控心内膜细胞的正常生长,一旦上述基因表达被干扰,细胞正常增殖将被抑制,凋亡细胞数量明显增多,从而影响心脏的正

常结构发育,最终导致 ASD 的发生^[2-3,18]。

基因上的 SNP 变异可能导致基因表达异常,对先天性心脏病的发病产生影响。欧洲人群中报道有 3 个 SNP 与 ASD 发病有显著影响,位于 STX18 基因上的 rs870142、rs16835979 和 rs6824295^[10],分别增加 45.6%、45.2%和 43.7% ASD 的患病风险。此外,目前报道中国人群与 ASD 发病有明确关联的 SNP 有 4 个^[11-13]:TBX15 基因上 rs2474937、MAML3 基因上 rs1531070、STX18 基因上 rs16835979 和 NKX 2.5 基因上 rs227792 位点。携带前 3 个位点的的突变型 GG (rs2474937)、AA (rs1531070)、AA (rs16835979) 可导致 ASD 发病率分别增加 40%、40%和 22%。值得一提的是,NKX 2.5 基因上 rs227792 位点对 ASD 发病的影响更为显著,相比携带 GG 基因型的人群,携带 AA 基因型人群 ASD 发病率增加 1 倍(OR:2.124, 95%CI:1.203~3.750, $P=0.009$)。

COL6A2 基因位于 21 号染色体长臂 2 区 2 带 3

亚带,其在骨骼肌和心肌细胞中均有显著表达。在骨骼肌中, COL6A2 促进骨骼肌细胞增殖,当 COL6A2 基因表达下调时,骨骼肌细胞的增殖受抑,继而引起骨骼肌功能障碍,导致先天性肌萎缩^[19]。在心血管方面的相关研究结果显示, COL6A2 的表达量异常与 ASD 发病有关^[6-8,20],但与较为热点的 GATA 家族基因相比, COL6A2 基因在 ASD 发病机制中所起的具体作用尚不明确。Weston 等^[21]通过细胞学研究发现 COL6A2 的基因表达水平可被血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)负向调节,当 VEGF-A 基因的表达受抑制, COL6A2 的表达水平会上调。在此基础上, Nynke 等^[22]的相关研究指出,将敲除 VEGF 基因的公鼠与母鼠交配,在子代小鼠中出现了明显的 ASD 表型,在对其心肌组织的基因表达检测中发现 COL6A2 的表达水平较正常心肌组织明显上调。同时通过对有家族遗传性先心病的患者以及非家族遗传性先心病患者体内的 COL6A2 变异进行检测,在 1 例非家族遗传性先心病患者体内检测出变异:c.316G>A (p. Glu106Lys)可能与 ASD 发病相关^[23],但该变异是否具有上调 COL6A2 基因表达活性的功能未予进一步探讨。本研究结果显示,rs1044598 对 ASD 的发病风险有显著影响,相比携带 TT 基因型的人群,携带 AA 基因型人群的 ASD 患病率降低约 36%。

miRNA 与 mRNA 相互结合的区域称“seed-region”。miRNA 通过其 5' 末端与靶基因 mRNA 上的 3'-UTR 区域在“seed-region”结合^[14],结合过程中,影响结合反应的因素有“热力学效应”以及“序列的互补程度”^[17]。本研究在对 COL6A2 3'-UTR 区域 rs1044598 位点进行功能预测时发现,rs1044598 位点不同基因型对 miR-4252 结合的 MFE 分别为 0 kcal/mol(TT)与-22.4 kcal/mol(AA),表明等位基因 T 突变为等位基因 A 时,miR-4252 与 COL6A2 mRNA 序列的互补程度增加,从而使 miR-4252 与 COL6A2 的结合力增高。

本研究荧光素酶报告基因功能实验表明,miR-4252 可以与 COL6A2 的 3'-UTR 区序列发生有效结合,与野生型 TT 基因型相比,突变型 AA 等位基因可使 miR-4252 结合更稳定,促使 COL6A2 的 mRNA 和基因表达水平下调,从而减少 ASD 的发病风险。

[参考文献]

[1] Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease[J]. *Nature*, 2008, 451(7181):943-948

[2] Misra C, Chang SW, Basu M, et al. Disruption of myocardial Gata4 and Tbx5 results in defects in cardiomyocyte proliferation and atrioventricular septation[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(19):5025-5035

[3] Terada R, Warren S, Lu JT, et al. Ablation of Nkx2-5 at mid-embryonic stage results in premature lethality and cardiac malformation[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2):289-299

[4] Francomano CA, Cutting GR, McCormick MK, et al. The COL6A1 and COL6A2 genes exist as a gene cluster and detect highly informative DNA polymorphisms in the telomeric region of human chromosome 21q [J]. *Hum Genet*, 1991, 87(2):162-166

[5] Gittenberger-De Groot, Bartram U, Oosthoek PW, et al. Collagen type VI expression during cardiac development and in human fetuses with trisomy 21[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003, 275(2):1109-1116

[6] Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene[J]. *Nature*, 1991, 352(6333):337-339

[7] Jander R, Rauterberg J, Glanville RW. Further characterization of the three polypeptide chains of bovine and human short-chain collagen (intima collagen) [J]. *Eur J Biochem*, 1983, 133(1):39-46

[8] Chu ML, Mann K, Deutzmann R, et al. Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones [J]. *Eur J Biochem*, 1987, 168(2):309-317

[9] Draus-Jm J, Hauck MM, Tomita-Mitchell A, et al. Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(2):115-122

[10] Cordell HJ, Bentham J, Topf A, et al. Genome-wide association study of multiple congenital heart disease phenotypes identifies a susceptibility locus for atrial septal defect at chromosome 4p16 [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7):822-824

[11] Yu C, Wang J, Wei C, et al. Genetic variations of NKX2-5 in sporadic atrial septal defect and ventricular septal defect in Chinese Yunnan population[J]. *Gene*, 2016, 575(1):29-33

[12] Zhao B, Lin Y, Xu J, et al. Replication of the 4p16 susceptibility locus in congenital heart disease in Han Chinese populations[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e107411

[13] Hu Z, Shi Y, Mo X, et al. A genome-wide association study identifies two risk loci for congenital heart malformations in Han Chinese populations[J]. *Nature Genet*, 2013, 45(7):818-821

[14] Porrello ER. microRNAs in cardiac development and re-

- generation[J]. *Clin Sci*,2013,125(4):151-166
- [15] Cai X,Hagedorn CH,Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped,polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs[J]. *RNA*,2005,10(12):1957-1966
- [16] Rodriguez A,Griffiths-Jones S,Ashurst JL,et al. Identification,of mammalian,microRNA,host,genes,and transcription,units[J]. *Genome Res*,2004,14(10A):1902-1910
- [17] Sabina S,Pulignani S,Rizzo M,et al. Germline hereditary,somatic mutations and microRNAs targeting-SNPs in congenital heart defects[J]. *J Mol Cell Cardiol*,2013,60(1):84-89
- [18] Tessarollo L. Targeted deletion of all isoforms of the *trkC* gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates *trkC* in normal cardiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,94(26):14776-14781
- [19] Zhang YZ,Zhao DH,Yang HP,et al. Novel collagen VI mutations identified in Chinese patients with Ullrich congenital muscular dystrophy[J]. *World Pediatr*,2014,10(2):126-132
- [20] Grossman TR,Gamliel A,Wessells RJ,et al. Over-expression of DSCAM and COL6A2 cooperatively generates congenital heart defects [J]. *Plos Genet*,2011,7(11):e1002344
- [21] Weston GC,Haviv I,Rogers PAW. Microarray analysis of VEGF-responsive genes in myometrial endothelial cells [J]. *Mol Hum Reprod*,2002,8(9):855-863
- [22] Nynke VDA,Molin DG,Peters PP,et al. Tetralogy of fallot and alterations in vascular endothelial growth factor-A signaling and notch signaling in mouse embryos solely expressing the VEGF120 isoform[J]. *Circ Res*,2007,100(6):842-849
- [23] Ackerman C,Locke AE,Feingold E,et al. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down-syndrome-associated atrioventricular septal defects[J]. *Am J Hum Genet*,2012,91(4):646-659
- [收稿日期] 2016-04-23

(上接第 1056 页)

- cancers[J]. *Am J Pathol*,2004,164(2):689-699
- [12] Okano M,Bell DW,Haber DA,et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development[J]. *Cell*,1999,99(3):247-257
- [13] You H,Ding W,Rountree CB. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-beta[J]. *Hepatology*,2010,51(5):1635-1644
- [14] Popkie AP,Zeidner LC,Albrecht AM,et al. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling via glycogen synthase kinase-3 (Gsk-3) regulates DNA methylation of imprinted loci[J]. *J Biol Chem*,2010,285(53):41337-41347
- [15] Luo X,Zhang Q,Liu V,et al. Cutting edge:TGF-beta-induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK[J]. *J Immunol*,2008,180(5):2757-2761
- [16] Lee MK,Pardoux C,Hall MC,et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA[J]. *EMBO J*,2007,26(17):3957-3967
- [17] Giehl K,Seidel B,Gierschik P,et al. TGFbeta1 represses proliferation of pancreatic carcinoma cells which correlates with Smad4-independent inhibition of ERK activation[J]. *Oncogene*,2000,19(39):4531-4541
- [18] Zhang Q,Chen L,Helfand BT,et al. TGF-beta regulates DNA methyltransferase expression in prostate cancer,correlates with aggressive capabilities,and predicts disease recurrence[J]. *PLoS One*,2011,6(9):e25168
- [收稿日期] 2015-10-21