

Clin Oncology, 1993, 11(7): 1376-1383.

[23] 王胜军, 许化溪, 王永忠, 等. CD4<sup>+</sup> CD25 调节性 T 细胞抑制小鼠自身免疫性甲状腺炎的发生[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(2): 102-106.

[24] Li MO, Wan YY, Flavell RAT. Cell-produced transforming growth factor $\beta$  controls T cell tolerance and regulates Th1 and Th 17-cell differentiation [J]. Immunity,

2007, 26(5): 579-591.

[25] Liu X, Yang P, Lin X, et al. inhibitory effect of Cyclosporin A and corticosteroids on the production of IFN-gamma and IL-18 by T cells in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome [J]. Clin Immunol, 2009, 131(2): 233-242.

(收稿日期: 2011-04-14 修回日期: 2011-05-26)

· 综 述 ·

## 先天性心脏病相关 bHLH 转录因子的研究进展\*

张永波 综述, 仇小强 审校

(桂林医学院附属医院心内科, 广西桂林 541001)

**关键词:** 心脏病; 转录因子; 心脏神经嵴衍生物表达蛋白

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2011. 29. 038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)29-3001-03

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是由于胚胎发育过程中相关基因异常, 导致心脏血管发育异常所形成的一组心血管系统畸形。CHD 是人类最常见的出生缺陷之一, 在新生儿中发病率估计为 0.4%~5%<sup>[1]</sup>, 为婴儿期非感染死亡的首位病因, 也是自然流产和死胎最常见的原因之一。据世界卫生组织统计资料显示, 全球每年约 150 万儿童出生时患有 CHD。因此, 完整理解心血管系统发育机制, 从分子水平探索预防和治疗 CHD 的措施, 对降低婴幼儿病死率、提高人口质量具有重要意义。

心脏是脊椎动物胚胎发育过程中最早形成的功能器官。心脏由不同胚层来源的细胞发育而来, 是各种细胞经过精准的特化、分化、迁移和组织结构的折叠、屈曲的结果。这一系列复杂的形态变化及精密的血流动力学改变均由一个核心转录因子调控网络控制, 其中主要包括碱性螺旋-环-螺旋蛋白 (bHLH)、NK2、GATA、TBX 等。该调控网络将上游诱导信号与下游调控基因联系起来, 控制心肌细胞的增殖和分化、心脏发育模式及形态发生和心脏收缩<sup>[2]</sup>。bHLH 蛋白家族成员众多、功能庞大在心脏形成过程中的作用尤为显著, 与 CHD 的发生关系密切。

### 1 bHLH 结构和功能

bHLH 包含 60 个左右氨基酸残基, 由两个  $\alpha$  螺旋通过一段环状结构相连接, 上游富含碱性氨基酸。两条双亲性  $\alpha$  螺旋的一侧有亮氨酸和苯丙氨酸等疏水氨基酸, 两条链依赖疏水氨基酸的相互作用形成同二聚体或异二聚体, 螺旋区含有各种保守的氨基酸残基。bHLH 通过螺旋-环-螺旋模体二聚体化, 使每个长螺旋的碱性部分与 DNA 上 E-盒序列 CANNTG 结合发挥调控作用。缺乏碱性区肽链的螺旋-环-螺旋蛋白与 bHLH 形成异二聚体, 可以阻止 bHLH 与 DNA 结合, 从而增加其调控作用的多样性。bHLH 几乎存在于所有的真核生物中, 是胚胎发育过程中重要的调节因子。已知动物 bHLH 超家族包含 6 个高阶组共 45 个家族, 每个家族由一至数个成员组成, 分别在生物体神经细胞、肌肉细胞、肠组织、心脏和造血细胞发育过程中发挥重要功能。目前研究认为与心血管发育

关系密切的 bHLH 超家族成员主要有 HAND 家族和 HRT 家族。

### 2 心脏神经嵴衍生物表达蛋白 (heart and neural crest derivatives, HAND) 家族

HAND 属于 A 组 bHLH 转录调节因子超家族成员, 能够与具有 CACCTG 或 CAGCTG 特征的 E 框 DNA 片段特异性结合。HAND 家族有两个成员 HAND1 和 HAND2。HAND 因子在不同物种之间表现出较高的氨基酸序列一致性, 说明其生物功能具有高度保守性<sup>[3-4]</sup>。在心血管形成前, HAND 首先在心脏前体侧壁中胚层、神经嵴和腮弓上表达, 然后持续表达于整个心脏发育过程中, 直到心腔分化完成。虽然在哺乳动物心脏形态形成和早期胚胎心血管不对称环化过程中 HAND1 和 HAND2 最初是共同表达的, 但随后 HAND1 逐渐主要局限于在左心室表达, HAND2 逐渐主要局限于在右心室表达<sup>[5]</sup>, 而在胚胎主动脉球囊、心室流出道以及早期室间隔中, HAND1 和 HAND2 基因仍共同表达<sup>[3-4]</sup>。在整个心脏发育进程中, HAND 基因表达逐渐下调。HAND 基因在成人心脏的表达水平非常低, 但在心脏出现疾病的时候可以再表达, 特别在心脏肥大时 HAND 基因呈显著的反应性高表达。HAND1 基因在左心室的发育过程中起重要作用, Reamon-Buettner 等<sup>[6]</sup> 研究发现, HAND1 的 bHLH 结构域一个功能缺失性移码突变 (p. A126fs) 在心脏发育不全中频发, 在房室间隔缺损的组织样本中, 他们检测到 32 个序列改变导致氨基酸的改变, 其中 12 个序列是在 HAND1 的 bHLH 结构域。由此可以认为, HAND1 对 CHD 的发生特别是房室间隔缺损的发生至关重要。Risebro 等<sup>[7]</sup> 通过培养胚胎干细胞源性心肌细胞研究揭示, 在 HAND1 缺失的背景条件下心肌细胞分化显著提高, 但决定心肌细胞命运的中胚层通路明显缺失。由此表明 HAND1 作为一个重要的心脏调节蛋白, 控制着心脏发育过程中细胞增殖和分化之间的平衡。此外, 当 HAND1 基因被插入到 Mlc2v 基因座内, HAND1 基因在整个左、右心室发育过程中呈强势过度表达并且引起房室间隔缺损<sup>[8]</sup>。Nkx2.5 基因敲除小鼠的心脏 HAND1 基因表达障碍并出现严重的心室畸形,

\* 基金项目: 广西自然科学基金重点项目 (2010GXNSFD013054)。

表明 HAND1 可能受 Nkx2.5 调控参与左心室的发育。HAND2 能够激活 UFD1、CDC45 等基因的转录, HAND2 基因敲除小鼠出现右心室发育不良。Shen 等<sup>[9]</sup>通过对 131 例中国 CHD 患儿 HAND2 突变体筛查表明, HAND2 可能是右心室和流出道狭窄的潜在候选基因。HAND2 缺失小鼠在胚胎发育 9.5~10.5 d 之间死于心脏和血管发育缺陷, 表明 HAND2 缺失对胚胎发育是致命性的。内皮素及其受体在胚胎神经嵴表达, 当其缺乏时可出现大血管和心室流出道发育缺陷。内皮素或其受体缺陷小鼠 HAND2 水平下调, HAND2 突变小鼠神经纤毛蛋白-1(Neuropilin-1, NRP-1)水平下调, 而 NRP-1 突变体与内皮素突变体具有相似的表型<sup>[10]</sup>, 表明在胚胎神经嵴发育过程中 HAND2 可能是调节内皮素和 NRP-1 表达的纽带。形态学研究显示, 当 HAND2 缺失时心管环化成为右心室的区域缺失。相关分子研究表明, 小鼠心肌细胞特化的发生是因为特异性心脏分子标记物的正常表达, 然而当 HAND2 缺失时特异性心室标记物 A 型尿钠肽前体(Nppa)的表达下调, 而且这种减少由一个直接转录效应引起<sup>[11]</sup>, 相比之下 HAND1 的转录则对 Nppa 的表达无影响。Zhao 等<sup>[12-13]</sup>经过靶点搜寻发现有一类 MicroRNA 特异地结合 HAND2 的 mRNA, 阻止其翻译成蛋白质, 提示 MicroRNA 的异常表达可以通过影响 HAND2 的表达而导致胚胎发育初期心肌前体细胞的扩增受限, 进而造成心室没有足够心肌细胞而发展为畸形。HAND 因子的转基因分析表明, HAND1 和 HAND2 都是心血管正常发育的必需因子。HAND1 和 HAND2 基因全部敲除的小鼠表现出心脏畸形<sup>[5]</sup>。当仅敲除心肌细胞系条件 HAND1 无效等位基因时, 围生期 HAND1 条件突变体表现出左心室和心内膜垫缺失、心室基因表达失调<sup>[14]</sup>。为了进一步了解 HAND 因子在心血管形态发育过程中调节心脏形成的机制以及直接检测 HAND1 和 HAND2 的功能冗余, Firuui 等<sup>[15]</sup>, 把 HAND2 基因插入到 HAND1 基因座内(HD1HD2), 值得注意的是, 含 HD1HD2 嵌合体百分比高的小鼠在出生时就已经死亡并表现出一系列先天性心脏畸形, 表型观察显示, 在正常发育的心脏中出现内源性 HAND1 表达。这些研究表明, 哺乳动物的 HAND 基因可能在心脏进化过程中具有错综复杂的特殊功能<sup>[14]</sup>, HAND 在胚胎发育不同阶段的选择性表达是正常心脏形态发育的关键因子。

### 3 Hairy 相关转录因子 (Hairy-related transcription factor, HRT)

HRT 属于 E 组 bHLH 转录因子超家族成员, 能够优先与具有 CACGCG 或 CACGAG 碱基的 N 框 DNA 序列结合, 动物 HRT 包括 HEY 家族和 HES 家族。HRT 具有 3 个保守结构域, 其中 bHLH 结构域和橙色结构域是共有结构域。HRT 的碱性区结构域有一个固定的甘氨酸, 能够与 DNA 特异性结合发挥转录抑制作用。Notch 信号通路的转录复合物对 HRT 基因表达具有转录激活作用, 由 HRT 编码的蛋白又能够进一步调控自身和其他下游分子的表达<sup>[16]</sup>, HRT 在 Notch 信号通路中发挥调节枢纽作用。HEY 家族有 3 个成员 HEY1、HEY2、HEYL, HEY1 和 HEY2 在房室交界区的表达具有明显的边界, 它们可能参与早期心管的分段。HEY1 首先表达于新月形生心区, 10.5 d 后局限于心房肌中; HEY2 在心管形成阶段表达于心室区, 当心腔形成后局限于心肌致密层<sup>[17]</sup>, HEY1 和 HEY2 的表达水平在出生后逐渐下降。房室管形成后, 在邻近

心肌诱导信号刺激下内皮细胞向间叶细胞转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT), 此时 HEY1、HEY2 和 HEYL 均在房室管的心内膜处表达。HEY1、HEY2 双突变会导致 EMT 不足, HEY1 和 HEYL 则在心血管发育过程中控制着内皮-间质细胞移行<sup>[18]</sup>。HEY1 和 HEYL 联合缺失造成 EMT 严重低下并导致膜部间隔缺损和瓣膜发育不良等多种心脏畸形。HEY2 基因缺陷小鼠出现心肌收缩功能受损、右心室畸形、室间隔缺损和法乐氏四联症<sup>[19]</sup>, 并且左心室中检出较多心房组织标志物(ANF、TBX5、Mlcl $\alpha$ /2a); 而当 HEY2 过度表达时, 心房标志物表达水平明显下降<sup>[20]</sup>。国内有文献研究发现<sup>[21-22]</sup>, 房间隔缺损和动脉导管未闭手术闭合后血清 ANF 水平显著下降。Fischer 等<sup>[23]</sup>认为, HEY2 通过抑制心室致密层中广泛存在的 GATA4 和 GATA6 活性, 防止心房标志物错误表达, 从而维持心肌的正常发育。HEY2 基因缺失将导致包括室间隔缺损、房室瓣膜缺陷、肺动脉瓣狭窄等心脏畸形的发生, 而 HEY1 基因敲除小鼠没有明显的病理表现。尽管如此, HEY1 和 HEY2 基因双敲除的小鼠却由于严重的心血管问题死于胚胎期。Kokubo 等<sup>[24]</sup>发现, HEY1 和 HEY2 基因双敲除小鼠表现出肌小梁缺陷, 虽然最初的心室腔具有致密部和小梁部, 可是接下来小梁部的心肌细胞凋亡最终导致肌小梁的发育缺陷。上述研究亦表明, 在心血管发育过程中 HEY1 和 HEY2 可能存在部分功能重叠。HEY1 和 HEYL 双失活小鼠也表现出严重的心脏畸形, 如膜性室间隔缺损、房室瓣和肺动脉瓣发育异常。HES 家族有 8 个成员, 其中 HES1、HES2 在心血管系统形成过程中具有重要作用。HES1 和 HES2 过度表达可以抑制心脏特异性转录因子 TBX2 和 BMP2, 导致房室管界线消失, HES1、HES2 基因敲除大鼠的 TBX2 和 BMP2 基因表达范围明显扩大, 表明 HES1 和 HES2 可以通过调控 TBX2 和 BMP2 基因表达影响房室管界线形成<sup>[25]</sup>。

综上所述, 一方面 bHLH 作为心脏形成过程中的核心转录因子, 可以与目的基因特异性结合调控靶基因转录, 同时 bHLH 的另一结构域可以与其他蛋白因子相互作用调节其调控转录的方向和速率。另一方面, 编码 bHLH 的基因又受其他转录因子的调控。如此一来不同蛋白因子和基因之间交织形成了一个精密的复杂调控网络。虽然通过大量研究, 目前对心血管发育的分子调控机制已有较多认识, 但离完整精确地理解还相差甚远, 更谈不上真正的用于临床治疗<sup>[26]</sup>。因此深入研究 bHLH 在心脏发育过程中的调控机制, 进一步了解其与 CHD 的关系具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] Pierpont ME, Basson CT, Benson DW Jr, et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on cardiovascular disease in the young: endorsed by the American Academy of Pediatrics [J]. *Circulation*, 2007, 115 (23): 3015-3038.
- [2] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart [J]. *Science*, 2006, 313 (5795): 1922-1927.
- [3] Conway SJ, Firulli AB. A bHLH code for cardiac morpho-

- genesis[J]. *Pediatr Cardiol*, 2010, 31(3): 318-324.
- [4] Firulli AB, Conway SJ. Combinatorial transcriptional interaction within the cardiac neural crest; a pair of HANDs in heart formation[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2004, 72(2): 151-161.
- [5] Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, et al. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1 [J]. *Nat Genet*, 1998, 18(3): 266-270.
- [6] Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Traverso I, et al. A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(19): 3567-3578.
- [7] Risebro CA, Smart N, Dupays L, et al. Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart[J]. *Development*, 2006, 133(22): 4595-4606.
- [8] Togi K, Kawamoto T, Yamauchi R, et al. Role of Hand1/eHAND in the dorso-ventral patterning and interventricular septum formation in the embryonic heart[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(11): 4627-4635.
- [9] Shen L, Li XF, Shen AD, et al. Transcription factor HAND2 mutations in sporadic Chinese patients with congenital heart disease [J]. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123(13): 1623-1627.
- [10] Yamagishi H, Olson EN, Srivastava D. The basic Helix-loop-Helix transcription factor dHAND is required for vascular development [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(3): 261-270.
- [11] Thattaliyath BD, Firulli BA, Firulli AB. The basic-helix-loop-helix transcription factor HAND2 directly regulates transcription of the atrial natriuretic peptide gene [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(10): 1325-1344.
- [12] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 181-182.
- [13] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-317.
- [14] McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, et al. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner [J]. *Development*, 2005, 132(1): 189-201.
- [15] Firulli AB, Firulli BA, Wang J, et al. Gene Replacement Strategies to Test the Functional Redundancy of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor [J]. *Pediatr Cardiol*, 2010, 31(3): 438-448.
- [16] Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch; interacting signaling pathways in tumour angiogenesis [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1204-1209.
- [17] Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(1): 99-115.
- [18] Fischer A, Steidl C, Wagner TU, et al. Combined loss of hey1 and heyL cause congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 856-863.
- [19] Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, et al. Targeted disruption of hesr2 results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction [J]. *Circ Res*, 2004, 95(5): 540-547.
- [20] Koibuchi N, Chin MT. CHF1/Hey2 plays a pivotal role in left ventricular maturation through suppression of ectopic atrial gene expression [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 850-855.
- [21] 陈莉, 张志辉, 宋治远. 动脉导管未闭封堵术前后血清 ANP、ET 的动态观察 [J]. *重庆医学*, 2006, 35(3): 209-211.
- [22] 陈莉, 宋治远, 郭燕丽, 等. 经导管房间隔缺损封堵术对血清 ANP、ET 及心腔大小的影响 [J]. *重庆医学*, 2006, 35(3): 210-211.
- [23] Fischer A, Klattig J, Kneitz B, et al. Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene ANF in fetal hearts [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(20): 8960-8970.
- [24] Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, et al. Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system [J]. *Dev Biol*, 2005, 278(2): 301-309.
- [25] Rutenberg JB, Fischer A, Jia H, et al. Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors [J]. *Development*, 2006, 133(21): 4381-4390.
- [26] Srivastava D. Making or breaking the heart; from lineage determination to morphogenesis [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1037-1048.