

论著·临床研究

先天性心脏病胎儿心脏及胎盘组织中 MAPK 及 Akt 信号通路分子的变化

徐洁¹ 杨中州² 张姝¹ 吴少亘¹ 胡娅莉¹

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院妇产科, 江苏 南京 210008; 2 南京大学模式动物研究所, 江苏 南京 210061)

[摘要] **目的** 检测先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 胎儿心脏及胎盘组织中 MAPK 及 Akt 信号通路分子表达变化, 探讨其在 CHD 发病过程中的作用。 **方法** 选取 10 例因患严重 CHD/或同时伴其他缺陷而引产的胎儿, 采用 Western blot 技术检测心脏左心室及胎盘组织中 p38、p38 α 、p-p38、MEF2、ERK、p-ERK Akt、p-Akt^{Ser473}、p-Akt^{Thr308} 蛋白表达量, 采用半定量 RT-PCR 方法检测左心室 p38 α mRNA 水平。7 例孕龄相似、无 CHD 畸形儿为对照组。 **结果** ①Western blot 结果显示: 与对照组相比, CHD 组中分别有 4 例心脏组织中 p38 及其亚型 p38 α 、6 例 p-p38、2 例 MEF2、8 例 p-ERK、4 例 Akt 及 8 例 p-Akt^{Ser473} 和 p-Akt^{Thr308} 蛋白水平降低, 2 例 p-p38 及 1 例 p-Akt^{Thr308} 升高; CHD 组中 3 例胎盘组织中 p-p38 上升, 2 例 p-ERK 下降。②CHD 组 MAPK 及 Akt 信号通路蛋白表达量在胎儿心脏与胎盘组织中的变化不一致。③与对照组相比, 4 例 p38 α 蛋白减少的心脏样本 p38 α 异构体 2 mRNA 水平均降低, 只有 1 例 p38 α 异构体 1、3、4 mRNA 也减少。 **结论** CHD 胎儿 MAPK 及 Akt 信号通路分子蛋白表达变化具有组织特异性, 心脏组织中 MAPK 及 Akt 信号通路的异常可能与人类 CHD 的发生有关。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(5):327-332]

[关键词] MAPK; Akt; 信号通路; 先天性心脏病; 胎儿

[中图分类号] R714.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)05-0327-06

Changes of MAPK and Akt signaling pathways in hearts and placentas of aborted fetuses with congenital heart disease

XU Jie, YANG Zhong-Zhou, ZHANG Shu, WU Shao-Gen, HU Ya-Li. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China (Hu Y-L, Email: yali_hu@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the changes of MAPK and Akt signaling pathways in hearts and placentas of aborted fetuses with congenital heart disease (CHD), and investigate their roles in the pathogenesis of CHD. **Methods** Ten aborted fetuses with severe CHD (CHD group) and 7 gestational age-matched non-cardiac malformation aborted fetuses (control group) were enrolled. Western blot analysis was undertaken to assess the expression of p38, p38 α , p-p38, MEF2, ERK, p-ERK, Akt, p-Akt^{Ser473} and p-Akt^{Thr308} in left ventricles and placentas of the fetuses, while semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis was used to detect the expression of p38 α isoforms mRNA in hearts. **Results** Compared with the heart samples of the control group, the protein expression levels of p38 and its α isoform in 4 cases, p-p38 in 6 cases, MEF2 in 2 cases, p-ERK in 8 cases, Akt in 4 cases, p-Akt^{Ser473} and p-Akt^{Thr308} in 8 cases decreased, while the protein expression levels of p-p38 in 2 cases and p-Akt^{Thr308} in 1 case increased. p-p38 protein level in 3 cases and p-ERK protein level in 2 cases decreased in placentas compared with the control group. The changes of protein expression of MAPK and Akt signaling pathway in hearts were not consistent with those in placentas in the CHD group. The expression of p38 α isoform2 mRNA showed descent tendency in 4 heart samples with CHD, while the expression of other three p38 α isoforms mRNA was reduced in only 1 sample compared with the control group. **Conclusions** Dysfunction of MAPK and Akt signaling pathways is tissue-specific in aborted fetuses with CHD. The perturbed two signaling pathways in hearts may contribute to the pathogenesis of human CHD. **[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(5):327-332]**

Key words: MAPK; Akt; Signaling pathway; Congenital heart disease; Fetus

[收稿日期]2009-09-30; [修回日期]2009-12-22

[基金项目]江苏省兴卫工程领军人才项目(LJ200628);江苏省社会事业发展项目(BS2006012);南京市卫生局重点项目(ZKX06018)。

[作者简介]徐洁,女,硕士研究生。

[通信作者]胡娅莉,教授。

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是威胁人类健康的重要疾病,在出生缺陷中占首位^[1-4]。CHD 的病因及发病机制复杂,可能涉及多个基因、多条信号通路的改变。因此,研究调控心血管发育和功能的分子机制,对于探讨 CHD 的发病机制、寻找新的治疗靶点具有重要意义。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛存在于各种动物细胞中的重要信号传导通路中,参与细胞增殖、分化、迁移和凋亡等过程。哺乳动物中主要有 4 条 MAPK 通路,其中,体外实验已经证实 p38 MAPK 通路参与调节心肌细胞的生长、分化、凋亡以及肥大^[5-6],而使用人类外周血进行基因突变筛查提示 ERK/MAPK 通路功能失调与伴有心脏异常表型的某些综合征有关,如努南综合征 (Noonan syndrome, NS)、Costello 综合征 (Costello syndrome, CS)、心-颜面-皮肤综合征 (cardio-facio-cutaneous syndrome, CFCS) 等^[7]。磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/Akt, PI3K/PKB/Akt) 是受体酪氨酸激酶的下游信号通路,也是膜受体信号向细胞内传导的重要途径,在胚胎发育、细胞分化、增殖、死亡等生物学过程中有重要调节作用。动物模型研究显示 Akt

蛋白是心脏发育的重要调节因素, Akt 突变小鼠具有心血管系统异常表型^[8]。基于上述研究成果,我们推测 MAPK 及 Akt 信号通路的异常可能与人类 CHD 的发生存在一定联系。本研究拟检测 CHD 和非 CHD 畸形胎儿左心室以及胎盘组织中 MAPK 及 Akt 通路几个重要成员的表达水平,观察其变化差异,以期探讨 MAPK 及 Akt 通路表达的变化在 CHD 发生过程中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

所有病例均为南京大学医学院附属鼓楼医院产前诊断中心经心脏超声诊断为畸形且引产后解剖证实为先天畸形的胎儿。留取胎儿心脏及胎盘标本。为排除心脏各部位信号通路分子表达量本身可能存在的差异,本实验中所使用的心脏样本均为左心室组织。根据孕龄,将 CHD 畸形儿分为晚孕组和中孕组,分别用相似孕龄的非 CHD 畸形儿心脏及胎盘作为对照。CHD 组及对照组胎儿孕龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。该研究经南京鼓楼医院伦理委员会批准,所有标本均经过家属的知情同意而用于科学研究。

表 1 CHD 组及对照组胎儿情况

分组	编号	孕龄(周, $\bar{x} \pm s$)	胎儿表型	
晚孕组				
CHD	01	32 ⁺⁵	心包积液,心胸比增大,心肌肥厚	
	02	36 ⁺²	33.9 ± 1.2	右位心,室缺,完全性大动脉转位,肺动脉闭锁, Dandy-walk 综合征
	03	33 ⁺⁴		右心增大,短肢畸形,羊水减少
	04	32 ⁺⁶	膈疝,左心发育不良,羊水过多	
对照	11	32	无脑儿,羊水过多	
	12	41	34.6 ± 3.2	脑积水,脊柱裂,脊膜膨出,足内翻
	13	34 ⁺³		Dandy-Walk 综合征
	14	31	脊柱裂,腹裂(泄殖腔外翻),单脐动脉	
中孕组				
CHD	05	22 ⁺⁵	右位心,脊柱裂,脊柱侧弯,腹裂,内脏外翻	
	06	27 ⁺⁶	室缺,房缺,右室双出口,大动脉转位	
	07	21 ⁺⁴	24.9 ± 1.8	嵴下型室缺,唇腭裂,骶尾部畸胎瘤,手畸形,脐疝
	08	25		染色体异常 47, XX, +18, 右心增大,室间隔缺损,主动脉骑跨
	09	24 ⁺⁶	房缺,右室双出口,膜部室缺	
	10	27 ⁺¹	右位心,单心室,永存动脉干,胸腔积液,内脏反位,羊水过多	
对照	15	24	侧脑室积水,双肾多囊泡肾,羊水过少	
	16	27 ⁺⁶	26.1 ± 0.4	皮下水肿,胸腹水
	17	26 ⁺⁴		染色体异常 46, XY, t(9,13),唇腭裂

1.2 研究方法

1.2.1 标本处理 死胎娩出后,即由病理科和心脏外科医师共同进行尸体解剖,确定诊断并拍摄心脏畸形部位照片,留取心脏左心室组织标本及胎盘组织标本,分别置于 1.5 mL EP 管中立即放入液氮,

后存入 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 Western blot 方法检测相关蛋白表达水平

分别取上述左心室及胎盘组织标本各约 200 mg, 加入 0.5 mL 裂解缓冲液。考马斯亮蓝法定量测定总蛋白量。每份蛋白样品取 100 μg 进行 SDS-PAGE

电泳,并将蛋白转至PVDF膜。转膜后用封闭液(封闭液配方:5%脱脂奶粉,50 mM Tris,150 mM NaCl,0.5 mM Tween-20,pH 7.5)封闭1 h后,4℃一抗孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min,二抗室温孵育2 h后继续用TBST洗膜3次,每次10 min。ECL反应后曝光显影。一抗来源:p38、p38 α 、p-p38、Erk、p-Erk、Akt、p-Akt^{Ser473}、p-Akt^{Thr308}、GAPDH抗体(Cell Signaling Technology CST),MEF2抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc),二抗:羊抗兔、羊抗鼠-HRP(Thermos Scientific)。

1.2.3 半定量RT-PCR分析p38 α 表达水平 取上述左心室组织约30 mg按Trizol(Invitrogen)说明书采用一步法提取总RNA,分光光度计测定RNA的浓度和纯度。按逆转录合成试剂盒(Invitrogen)说明书合成cDNA待用。p38 α 异构体1目的片段359 bp,复性温度为57℃,引物序列为:5'-CCCCGCTTATCTCATTAAACAGGATG-3'(F),5'-CTCAGGACTCCATCTCTTCTTGG-3'(R);p38 α 异构体2目的片段383 bp,复性温度为57℃,引物序列为:5'-CATTTTAAGACTCGTTGGAACCC-3'(F),5'-CTCAGGACTCCATCTCTTCTTGG-3'(R);p38 α 异构体3目的片段813 bp,复性温度为59℃,引物序列为:5'-ATGTCTCAGGAGAGGCCACG-3'(F),5'-CGCAAAGTTCATCTTCGGCAT-3'(R);p38 α 异构体4目的片段860 bp,复性温度为59℃,引物序列为:5'-ATGTCTCAGGAGAGGCCACG-3'(F),5'-ATCGTGTACTGAGCAAAGTAGGC-3'(R)。上述PCR扩增条件:94℃变性5 min,然后以94℃ 30 s,相应复性温度复性30 s,72℃ 50 s循环35次,72℃延伸5 min。GAPDH作为内参照,目的片段255 bp,引物序列为:5'-GGAGCCAAAAGGGTCATCA-3'(F);5'-

GCCATCAGGCCACAGTTTC-3'(R)。PCR扩增条件:94℃变性5 min,然后以94℃ 30 s,56℃复性30 s,72℃ 30 s循环25次,72℃延伸5 min。所有引物均由上海英骏生物技术公司合成。

1.2.4 统计学处理 SPSS 17.0软件进行数据处理。孕期以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,CHD组与对照组孕龄比较采用独立样本均数间t检验。心脏与胎盘组织蛋白检测结果比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况

CHD组和对照组的孕龄及胎儿表型见表1。

2.2 心脏组织中MAPK及AKT信号通路分子蛋白的表达变化

10例CHD畸形儿有8例p38 MAPK信号通路较对照组不同,包括:编号为01~04 4例p38及其亚型p38 α 、活化形式p-p38均降低,编号为05、06 2例仅p-p38减少,07及09的p-p38水平升高。其中,仅有01、02这2例表现为p38 α 重要下游底物MEF2蛋白减少。另外,共有8例ERK/MAPK通路信号较对照组有变化,即编号为01~04、07~10的p-ERK水平明显下降。

10例CHD畸形儿中,编号为01~04 4例Akt蛋白水平下降,其活化形式p-Akt^{Ser473}、p-Akt^{Thr308}除上述4例外,还有编号为06、08~10共8例较对照组降低,而07的p-Akt^{Thr308}却较对照组升高。

与对照组相比,每个样本均有至少一条信号通路的异常。结果见图1。

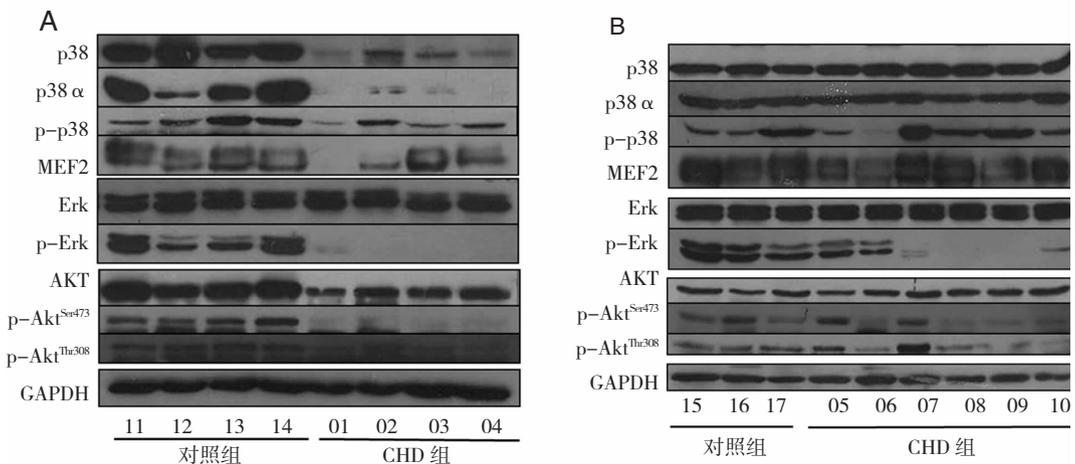


图1 胎儿心脏组织中MAPK及AKT信号通路分子蛋白的表达 图A、B分别为晚孕组和中孕组心脏中信号通路分子蛋白表达量。

2.3 胎盘组织中 MAPK 及 AKT 信号通路分子蛋白的表达变化

10 例 CHD 畸形儿中,有 5 例胎盘 MAPK 通路活化水平较对照组有变化,分别为:编号 02、03、07 3 例 p-p38 增多,编号为 05、06 2 例 p-ERK 水平降

低。而 P38 MAPK 通路的下游底物 MEF2 蛋白在胎盘表达量较低,Western blot 方法未能检测到其表达量。所有样本 Akt 通路蛋白表达量与对照组相比无明显变化。结果见图 2。

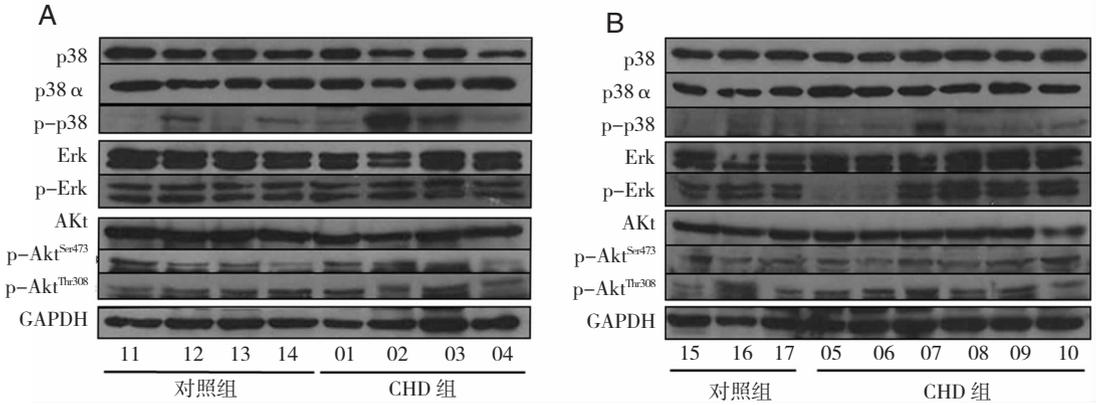


图 2 胎儿胎盘组织中 MAPK 及 AKT 信号通路分子蛋白的表达 图 A、B 分别为晚孕组和中孕组胎盘中信号通路分子蛋白表达量。

统计学分析显示 CHD 畸形儿心脏与胎盘组织中 p38、p38α、p-p38、ERK、p-ERK 及 Akt、p-Akt^{Ser473}、p-Akt^{Thr308} 蛋白表达量的变化不一致,认为这两条信号通路蛋白表达的变化具有组织特异性,心脏 MAPK 及 Akt 信号通路的变化与人类 CHD 的发生有着更密切联系。

2.4 4 例心脏组织 p38α 蛋白下降的样本 p38α mRNA 的表达变化

01~04 这 4 例样本的 p38α 异构体 2 mRNA 较对照组不同程度降低,与蛋白表达水平一致,而 p38α 另外 3 个异构体,只有 01 样本表达下降,其余 3 例无明显改变。结果见图 3。

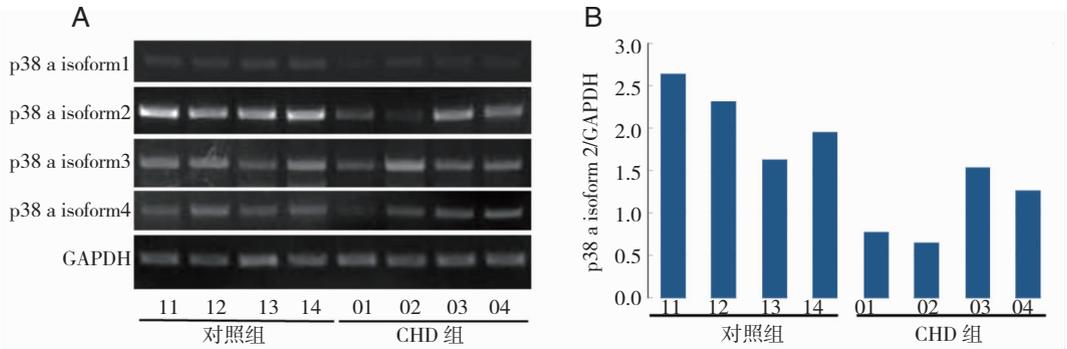


图 3 胎儿心脏组织中 p38α mRNA 的表达 图 A 为 4 例 CHD 胎儿与对照组胎儿心脏组织中 p38α 4 个异构体 mRNA 表达量,图 B 为两组 p38α 异构体 2 mRNA 表达差异的定量分析。

3 讨论

心脏发育从中胚层细胞的分化、线性心血管形成至最终四腔室心脏的形成,受到多条信号通路严密而精确的调控。目前人们普遍认为,调控心脏发育

的这些信号传导通路异常可能引起 CHD 的发生^[9]。

p38 MAPK 具有 4 种亚型,即 α、β、γ 和 δ,其分布具有组织特异性,其中,p38α 主要存在于心脏、胎盘、小脑、骨髓、外周白细胞和肝脏等,与心血管发育的关系最为密切。p38α 基因敲除的小鼠常因胎盘血管发育缺陷于胚胎 10.5 d 死亡^[10-11]。p38α 还参

与调节心肌细胞的分化、凋亡以及肥大^[5-6]。本研究从蛋白水平分析了 CHD 胎儿心脏组织中 p38 MAPK 信号通路分子表达的变化情况,与对照组相比,4 例晚孕组心脏样本 p38 及 p38 α 下调,而中孕组表达量并无显著差异。中、晚孕组心脏组织中 p38 信号通路分子变化所呈现出来的这种差异可能主要与胚胎期心脏发育的阶段性与否有关,提示 p38 MAPK 途径可能对胚胎后期的心脏发育作用更重要。考虑到人类 p38 α 具有 4 种异构体,本研究针对 4 种异构体分别设计了引物,利用半定量 RT-PCR 方法检测其 mRNA 表达水平,结果显示在这些左心室组织中 p38 α 异构体 2 的表达量较高,且 CHD 畸形儿心脏组织中的表达量较对照组有明显的下降,与蛋白水平研究结果一致。而 p38 α 其余 3 个异构体只有 1 例较对照组表达量减少。在小鼠中 p38 α 基因仅有一种,与人类 p38 α 异构体 2 同源性最高。基于生物进化过程中基因的保守性并结合上述实验结果,我们推测 p38 α 4 个异构体在人类心脏组织中的表达量以 p38 α 异构体 2 最多,且其可能与 CHD 的发生关系最为密切。MEF-2 (myocyte enhancer factor-2) 家族是 MAPK 途径重要的下游底物,其上游分子主要有 p38 α 和 ERK5 等,参与调节许多心脏结构及收缩蛋白的表达。其中,MEF2C 和 MEF2A 是 MEF-2 家族成员中与心血管发育最为密切的两个因子,MEF2C 突变小鼠心脏环化失败^[12],MEF2A 基因缺失小鼠也存在一系列的心血管缺陷^[13],两种小鼠分别于胚胎 9.5 d 及围产期死亡。Hernandez-Torres 等^[14]发现 p38 α 缺失后 MEF2 表达下降且造成心肌肌节生成减少,揭示了 p38 α MAPK/MEF2 信号通路在心脏发育过程中的重要作用。本研究所使用的 MEF2 抗体主要识别其 4 个成员中的 MEF2A 以及一小部分的 MEF2C 及 MEF2D,结果显示 p38 α 水平降低较显著,2 个心脏样本 MEF2 蛋白也相应下调,进一步证实了 p38 α 与 MEF2 两者之间的关系,说明 p38 α MAPK/MEF2 信号通路的异常可能与人类 CHD 发生存在一定联系。而在其他几例样本中,MEF2 蛋白表达量并无明显改变,这可能是由于其他途径如 ERK5 MAPK/MEF2 信号通路代偿的结果。此外,本研究中 02 及 04 两例虽然 p38 蛋白减少,但是 p-p38 降低并不十分明显,推测可能 p38 蛋白表达水平要降低到一定水平才会影响其活性,导致信号传导中断,使下游的 MEF2 蛋白表达降低。

心脏是胚胎发育过程中最早由中胚层细胞发育而来的器官。模式动物研究显示 Erk2 能调控小鼠中胚层的分化^[15]。Erk2 基因功能缺失的小鼠因中

胚层分化异常于胚胎 6.5 d 死亡^[15],推测 Erk2 基因功能异常可能会影响心脏的正常发育。基因突变筛查发现,伴有 CHD 的一些先天发育异常综合征(如 NS, CS, CFCS 等)具有 PTPN11、KRAS、RAF1、MEK1、SOS1 等基因突变,这些突变会影响 ERK/MAPK 通路传导信号强弱的变化^[7]。转基因小鼠模型进一步证实,心脏特异性表达某些突变基因时将引起 ERK/MAPK 传导通路变化导致 CHD 发生^[16],提示该通路可能是 CHD 发病机制的基本途径之一。本研究在 10 例 CHD 胎儿心脏组织中发现有 8 例表现为 ERK/MAPK 的信号减弱,阳性率达 80%。这是在人类 CHD 病例中对上述动物实验研究所得结果的进一步验证与补充,再次证明了 ERK/MAPK 信号通路异常可能与人类 CHD 的发生密切相关。

PI3K/Akt 是中胚层细胞特异性表达心脏转录因子过程中的关键调节因素。活化的 Akt 蛋白可以通过激活 mTOR 和/或抑制 GSK3 β 、FOXO 等来调节心肌细胞的生长。作者前期制作的 Akt1^{-/-}Akt3^{+/-}基因敲除小鼠心脏较正常对照组小,部分小鼠表现为房间隔缺损(ASD)、室间隔肌部缺损或具有瓣膜的增厚^[8],说明该信号通路参与了小鼠胚胎心脏发育过程。而本研究发现 9 例 CHD 胎儿心脏组织 Akt 信号通路发生变化,其中有 5 例(55.56%)具有 ASD 或者 VSD 的表型,与动物模型研究得到的结论相似。此外,研究表明 PI3K/Akt 与 MAPK 信号通路关系密切,p38 MAPK 可直接调节 Akt 的转录活性及蛋白水平影响肌细胞的生成,而反过来 Akt 对 p38 则无此作用^[17]。本研究中,晚孕组 p38、p38 α 及 Akt 分子与对照组相比差异显著,而中孕组均无明显变化。因此我们认为晚孕组中 Akt 通路分子表达量的变化可能是 p38 MAPK 途径改变引起的下游事件,这进一步说明了 p38 MAPK 与 Akt 通路之间的相互作用。

另外值得注意的是,本研究中与对照组相比,某些心脏样本表现为信号分子总蛋白及其磷酸化活化形式均有改变,如 01~04 这 4 个样本 p38 及 p-p38、Akt 及 p-Akt^{Ser473}、p-Akt^{Thr308} 蛋白均下降;而某些样本仅表现为蛋白磷酸化活化形式的不同,如 05、06 等 4 个样本仅有 p-p38 水平的变化而 p38 蛋白与对照组相似,除 05、06 之外的 8 个样本均表现为 ERK 不变而 p-ERK 下降等。推测可能有两种原因:一是导致人类疾病发生的某些基因 SNP 位点可能会引起蛋白表达量的变化从而影响信号的传导。曾经被报道与精神分裂症发病有关的 Akt1 基因内含子中 C15674T(rs3730358)会引起 Akt1 蛋白表达水平的

下降^[18],这一结论在本实验组前期对CHD患儿外周血Akt基因SNP位点的研究中也得以证实^[19];二是在信号传递过程中,位于该信号通路上游的某些基因突变可能使信号传递终止导致下游蛋白不能被激活。例如Senawong等^[20]研究发现心-颜面-皮肤综合征患者MEK1基因的F53S及Y130C突变引起ERK蛋白不能被激活,信号传导终止,但是ERK蛋白本身表达量并无变化。

[参 考 文 献]

[1] Botto LD, Correa A, Erickson JD. Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects[J]. *Pediatrics*, 2001, 107(3): E32.

[2] 周建军,胡娅莉,刘启兰,陈启光,许碧云.江苏省以人群为基础的出生缺陷调查结果分析[J]. *江苏医药*, 2007, 33(12): 1218-1220.

[3] 杨江帆,许月珍,李萍,杨戎威.新生儿先天性心脏病患病率的调查和孕妇增补叶酸的预防效果[J]. *中国当代儿科杂志*, 2000, 2(5): 320-325.

[4] 中华医学会儿科学分会新生儿学组.中国住院新生儿流行病学调查[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(1): 15-20.

[5] Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han J, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2161-2168.

[6] Davidson SM, Morange M. Hsp25 and the p38 MAPK pathway are involved in differentiation of cardiomyocytes[J]. *Dev Biol*, 2000, 218(2): 146-160.

[7] Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes; novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders[J]. *Hum Mutat*, 2008, 29(8): 992-1006.

[8] Yang ZZ, Tschopp O, Di-Poi N, Bruder E, Baudry A, Dummler B, et al. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(23): 10407-10418.

[9] 吴秀山. 信号调控与心脏发育[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 279-366; 409-426.

[10] Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli

S, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 109-116.

[11] Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, et al. Essential role for p38alpha mitogen activated protein kinase in placental angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(19): 10454-10459.

[12] Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C[J]. *Science*, 1997, 276(5317): 1404-1407.

[13] Naya FJ, Black BL, Wu H, Bassel-Duby R, Richardson JA, Hill JA, et al. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1303-1309.

[14] Hernandez-Torres F, Martinez-Fernandez S, Zuluaga S, Nebreda A, Porras A, Aranega AE, et al. A role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in embryonic cardiac differentiation[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(7): 1025-1031.

[15] Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(22): 12759-12764.

[16] Nakamura T, Colbert M, Krenz M, Molkentin JD, Hahn HS, Dorn GW 2nd, et al. Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2123-2132.

[17] Cabane C, Coldefy AS, Yeow K, Derijard B. The p38 pathway regulates Akt both at protein and transcriptional activation levels during myogenesis[J]. *Cell Signal*, 2004, 16(12): 1405-1415.

[18] Tan HY, Nicodemus KK, Chen Q, Li Z, Brooke JK, Honea R, et al. Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2200-2208.

[19] 东亚琴,常在,莫绪明,杨中州. Akt基因多态性与先天性心脏病发病关系的研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2009, 8(1): 20-24.

[20] Senawong T, Phuchareon J, Ohara O, McCormick F, Rauen KA, Tetsu O. Germline mutations of MEK in cardio-facio-cutaneous syndrome are sensitive to MEK and RAF inhibition; implications for therapeutic options[J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(3): 419-430.

(本文编辑:王庆红)