

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.10.003

先心病专题

法洛四联症患儿组蛋白乙酰化及其酶的表达

徐君^{1,2} 林怡翔^{1,2} 顾若漪^{1,2} 王慧君^{1,2} 马晓静^{1,2} 马端² 黄国英^{1,2}

(1. 复旦大学附属儿科医院, 上海 201102;
2. 上海市出生缺陷防治重点实验室, 上海 200032)

〔摘要〕 目的 观察组蛋白乙酰转移酶(HATs)及组蛋白去乙酰化酶(HDACs)在法洛四联症(TOF)患儿中的表达情况,探讨组蛋白乙酰化及其酶在TOF发病中的作用。方法 TOF组心肌组织标本来源于46例行TOF根治术患儿,对照组心肌组织标本来源于16例意外死亡经尸检未发现心脏畸形的儿童。采用免疫组织化学染色法检测TOF组和对照组中H3K9、H3K18、H3K27 3个组蛋白乙酰化位点的乙酰化水平;采用Real-time PCR技术筛选TOF组与对照组心肌组织中组蛋白乙酰化相关酶HATs和HDACs的mRNA表达水平,并分析其与组蛋白乙酰化水平的相关性。结果 与对照组比较,TOF组H3K9位点的乙酰化水平明显增高($P=0.0165$);而H3K18、H3K27两个位点的乙酰化水平明显降低(均 $P<0.05$)。分别对4个HATs和6个HDACs检测发现,TOF组中EP300和CBP mRNA水平较对照组升高(均 $P<0.05$);而其他HATs和HDACs mRNA表达水平在两组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。相关分析显示,H3K9乙酰化水平与EP300和CBP mRNA表达呈显著正相关(分别 $r=0.71$ 、 0.72 ,均 $P<0.01$)。结论 H3K9乙酰化水平增高可能与EP300和CBP mRNA表达上调呈正相关,提示EP300和CBP可能是通过调控H3K9乙酰化状态影响心脏发育。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(10): 817-821]

〔关键词〕 组蛋白乙酰化;组蛋白乙酰转移酶;组蛋白去乙酰化酶;法洛四联症;儿童

Histone acetylation and expression of acetylation-related enzymes in children with tetralogy of Fallot

XU Jun, LIN Yi-Xiang, GU Ruo-Yi, WANG Hui-Jun, MA Xiao-Jing, MA Duan, HUANG Guo-Ying. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China (Huang G-Y, Email: gyhuang@shmu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the expression of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) in children with tetralogy of Fallot (TOF), and to investigate the role of histone acetylation and acetylation-related enzymes in the pathogenesis of TOF. **Methods** Myocardial tissue samples in the TOF group were obtained from 46 children with TOF who underwent radical operation, and myocardial tissue samples in the control group were obtained from 16 children who suffered accidental deaths and had no cardiac anomalies as shown by autopsy. The acetylation of H3K9, H3K18 and H3K27 was evaluated by immunohistochemistry. The mRNA expression of HATs and HDACs in the myocardium was measured by real-time PCR. The correlation between mRNA expression of HATs and HDACs and histone acetylation was analyzed. **Results** Compared with the control group, the TOF group showed significantly increased acetylation of H3K9 ($P=0.0165$) and significantly decreased acetylation of H3K18 ($P=0.0048$) and H3K27 ($P=0.0084$). As to 4 HATs and 6 HDACs, the mRNA expression of EP300 and CBP was significantly higher in the TOF group than in the control group ($P=0.025$; $P=0.017$), and there was no significant difference in the mRNA expression of other HATs and HDACs between the two groups. The correlation analysis revealed a positive correlation between H3K9 acetylation and mRNA expression of EP300 ($r=0.71$, $P<0.01$) and CBP ($r=0.72$, $P<0.01$). **Conclusions** Upregulated mRNA expression of EP300 and CBP may be associated with increased H3K9 acetylation, suggesting that EP300 and CBP might affect cardiac development by regulating H3K9 acetylation.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(10): 817-821]

Key words: Histone acetylation; Histone acetyltransferases; Histone deacetylases; Tetralogy of Fallot; Child

[收稿日期] 2013-08-23; [修回日期] 2013-09-10

[基金项目] 国家“973”项目(2010CB529504); 国家自然科学基金重点项目(30930096); 上海市科委委员科研计划连续资助项目(11JC1401400)。

[作者简介] 徐君,女,博士研究生。

[通信作者] 黄国英,教授。

法洛四联症 (Tetralogy of fallot, TOF) 是以肺动脉狭窄、主动脉骑跨、室间隔缺损、右心室肥厚为主要病理特征的青紫型先天性心脏病 (先心病), 发病率为 30/10 万, 是新生儿时期最常见的复杂型先心病^[1]。目前认为 TOF 是多基因遗传性疾病, 但其发病机制仍不清楚。

本课题组前期研究发现 TOF 患儿的 Cx43^[2]、RXRA^[3]、HIRA^[4] 等基因存在突变, 这些突变可部分解释先心病候选基因表达异常或者蛋白结构异常, 但其突变率非常低, 如 RXRA 基因转录起始位点上游 1191 bp 处的杂合突变 -1191A>AG 的突变率仅为 1/500^[3]。如此看来, 基因变异仅能解释小部分 TOF 的发病原因。除了基因突变会影响基因的转录、剪切、翻译等过程外, 表观遗传因素亦参与其中。表观遗传是指 DNA 序列不发生变化, 但基因表达却发生改变, 这种改变是细胞内除遗传信息以外的其他可遗传物质发生的改变, 且这种改变在发育和细胞增殖过程中能稳定遗传, 主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA 调控等^[5]。组蛋白修饰通过改变染色质结构并与其他调控蛋白相关作用, 调控基因表达, 影响疾病的发生发展, 被称为“第二遗传密码”。组蛋白乙酰化是最常见的组蛋白修饰之一, 主要通过改变与 DNA 的亲合力来调控基因表达, 在生长发育过程中起重要作用^[6]。组蛋白乙酰化主要发生在赖氨酸残基上, 受组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferases, HATs) 及组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 共同作用。有研究发现, 众多 HATs 及 HDACs 异常会导致心脏畸形的发生和先心病候选基因的表达异常, 如下调 HATs EP300 可使先心病候选基因 NKX2.5、GATA4、MEF2C 表达明显下调^[7]; 另一先心病候选基因 Tbx1 表达受 HATs MOZ 调控, MOZ 突变小鼠可表现 DiGeorge 综合征样表型 (即心脏缺陷、面部畸形和免疫功能障碍等)^[8]; 又如敲除 HDACs Hdac3 的小鼠出现动脉导管缺如、完全性大动脉转位、TOF 和右室双出口等畸形^[9]; 再如 HATs hNAT1/mNAT2 主要表达于主动脉、肺动脉、心脏及大血管瓣膜, 敲除该基因后可影响心脏结构尤其是瓣膜发育^[10]。上述这些研究结果均显示组蛋白乙酰化与心脏发育密切相关。然而, 组蛋白乙酰化如何导致 TOF 尚不清楚。因此, 本研究通过观察 HATs (EP300、CBP、MOZ、TIP60) 及 HDACs (HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC11) 在 TOF 患儿中的表达, 探讨组蛋白乙酰化及其转移酶在 TOF 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年到 2012 年复旦大学附属儿科医院经心导管检查及外科手术证实为 TOF 的 46 例患儿为研究对象 (TOF 组), 男女比例为 2:1, 平均年龄为 20 个月; 所有患儿智力发育正常, 无明显面容异常, X 线胸片及 B 超等常规检查均未发现合并其他主要脏器畸形; 手术过程中采集所有患儿流出道心肌组织。同期采集在复旦大学法医学系 16 例经尸检未发现明显心脏疾病的儿童的流出道心肌组织为对照, 对照组性别与年龄尽量与 TOF 组匹配。本研究经复旦大学附属儿科医院伦理委员会批准, 所有患儿由其父母签署知情同意后进入本研究。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器和试剂 Trizol 试剂和免疫组化检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒和 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自日本 Takara 公司; H3K9ac 抗体、H3K18ac 抗体和 H3K27ac 抗体均由美国 Abcam 公司提供。PCR 仪 (Mastercycler nexus) 为德国 Eppendorf 公司产品; Real-time PCR 仪 (ABI-7900) 为美国 ABI 公司产品。

1.2.2 免疫组织化学 将心脏手术获得的 TOF 组心肌组织及尸检获得的对照组心肌组织经福尔马林固定过夜后制成 4 μ m 的石蜡切片。切片经常规脱蜡水化、抗原修复后, 分别加入 H3K9ac 抗体 (1:1400)、H3K18ac 抗体 (1:1000) 和 H3K27ac 抗体 (1:1200) 的一抗于 37℃ 恒温箱内孵育 1 h, 转至 4℃ 冰箱保存过夜。次日 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加入二抗 37℃ 孵育 30 min; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; DAB 染色, 显色后蒸馏水终止反应, 苏木素染核, 清洗后常规封片。每个心肌组织随机选取 3 张切片, 每张切片于光镜下 (10×40) 随机选取 10 个视野清晰且组织结构正常的区域, 观察 TOF 组与对照组 H3K9ac、H3K18ac 和 H3K27ac 的染色程度。免疫组化结果判定: 胞质核呈棕色者为阳性反应细胞, 根据阳性反应的程度分为阴性 (-) 和阳性 (+~5+)。

1.2.3 mRNA 的抽提及逆转录 采用 Trizol 方法提取总 mRNA。首先将心肌组织液氮冷冻后砸碎, 加入 Trizol 匀浆, 待细胞完全裂解后加入氯仿使水相有机相分离。离心后取水相, 加入异丙醇沉淀 RNA; 再加入 75% 乙醇清洗杂质, 干燥后用 56℃ 水溶解。紫外分光光度仪测定 mRNA 质量并定量, 按逆转录试剂盒 (Takara) 操作步骤逆转录合成

cDNA, 储存于 -80°C 冰箱备用。

1.2.4 引物合成 目的产物扩增良好, 无引物二聚体, 大多数标本在循环数内达到平台期, 溶解曲线为单峰, 说明产物扩增特异性好, 没有非特异性扩增, 所有引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物

引物名称	引物序列 (5' → 3')	片段长度 (bp)
组蛋白去乙酰化酶引物 (HDACs)		
HDAC1-F	TGGTGACGGCGTGGA	155
HDAC1-R	CGTCTCGGAGCGGGTAGT	
HDAC2-F	TGTGCTGCAGACTCATTATCT	122
HDAC2-R	CCTCTCCAAGCATCAGTAA	
HDAC3-F	TACTTTGCCCCAGACTTCACA	120
HDAC3-R	GTTCAGCATCTTCAGGTTTCA	
HDAC4-F	GGCTGTGGGCTGCGTGGTAG	144
HDAC4-R	GCCACGGCCACGGAGTTGAA	
HDAC5-F	GCCCTGGAGGGAGGCCATGACTT	140
HDAC5-R	AGCGTGGCCACTGCGTTGATGT	
HDAC11-F	GCGGACATCACGCTCGCCAT	196
HDAC11-R	GCCTGATGGCCTGCTTGGC	
组蛋白乙酰转移酶引物 (HATs)		
EP300-F	AGGCTGTATCAGAGCGTATTGT	197
EP300-R	TGTGCTTTCATTGCTGGTGT	
CBP-F	TGACGGCGTGGATGCTCTGCTT	142
CBP-R	AACGGCTGTGCGGAGGCAAC	
MOZ-F	CTTCCGTCGTTTGTCTTCCG	183
MOZ-R	GGTGTGGATGTATCTGGCTCA	
TIP60-F	ATTTACCGCAAGGGCACCAT	196
TIP60-R	CCTTGGAGAAGTAGCCCACG	
内参引物		
B2M-F	TGGAGGCTATCCAGCGTACT	111
B2M-R	TGTCGGATGGATGAAACCCAG	
GAPDH-F	CACCCACTCCTCCACCTTTG	108
GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC	

1.2.5 Real-time PCR 分析 利用 SYBR Green 染料在 Real-time PCR 仪上检测基因的表达水平, 反应体系共 $10\ \mu\text{L}$: 其中上下游引物各 $0.5\ \mu\text{L}$, cDNA $2\ \mu\text{L}$, H_2O $2\ \mu\text{L}$, SYBR Green Real-time PCR Master Mix $5\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 预变性 $30\ \text{s}$; 95°C $5\ \text{s}$, 60°C $34\ \text{s}$, 扩增 40 个循环。反应完成后, 软件将自动进行数据分析计算出 Ct 值, 每份标本扩增 3 复管, 取其均值计算其表达水平并计算患儿和正常儿童表达差异值。 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\text{内参基因})$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{患儿}) - \Delta\text{Ct}(\text{对照})$, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (目的样本) / $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (参照样本) 即基因相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两

组间比较采用 t 检验; 等级资料采用 Mann-Whitney 法进行比较; 相关性研究采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TOF 患儿心肌组蛋白乙酰化水平变化

选取 5 例对照组和 10 例 TOF 组心肌组织标本进行组蛋白乙酰化水平检测, 免疫组化实验结果显示, H3K9 位点乙酰化水平在 TOF 组心肌中明显高于对照组 ($U=5.0$, $P=0.0165$); H3K18 乙酰化水平较对照组降低 ($U=1.5$, $P=0.0048$); 与 H3K18 相同, TOF 患儿的心肌流出道组织 H3K27 乙酰化水平也较对照组降低 ($U=3.0$, $P=0.0084$)。结果提示 TOF 患儿心肌组织中组蛋白乙酰化修饰存在异常。见图 1。

2.2 HATs 和 HDACs 在 TOF 组心肌组织中的表达

EP300 和 CBP 是一对具有协同作用的 HATs, Real-time PCR 检测发现, TOF 组 EP300 mRNA 表达水平较对照组升高 ($P=0.025$), 其协同作用因子 CBP mRNA 表达水平在 TOF 组亦高于对照组 ($P=0.017$); 而 HATs MOZ 和 TIP60 mRNA 表达水平在两组间差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。检测两组心肌样本中 HDACs HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5 和 HDAC11 的 mRNA 表达水平; 6 个 HDACs mRNA 表达水平在两组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3 TOF 患儿 EP300 及 CBP mRNA 表达与心肌组蛋白乙酰化水平的相关性分析

对 9 例 TOF 组和 5 例对照组心肌组织 EP300 及 CBP mRNA 的表达与心肌组蛋白乙酰化水平进行 Pearson 相关分析结果显示, 无论以 GAPDH 还是 B2M 为内参, 组蛋白 H3K9 乙酰化水平与 EP300 mRNA 表达均呈正相关 (分别 $r=0.71$ 、 0.66 ; 均 $P < 0.05$); 与 CBP mRNA 表达亦均呈正相关 (分别 $r=0.72$ 、 0.72 ; 均 $P < 0.01$) (图 2)。以 B2M 为内参时, 组蛋白 H3K18 乙酰化水平与 EP300 及 CBP mRNA 表达均呈负相关 (分别 $r=-0.60$ 、 -0.60 ; 均 $P < 0.05$); 但是以 GAPDH 为内参时, 组蛋白 H3K18 乙酰化水平与 EP300 及 CBP mRNA 表达均无相关性 (分别 $r=-0.39$ 、 -0.42 ; 均 $P > 0.05$)。无论以 GAPDH 还是 B2M 为内参, 组蛋白 H3K27 乙酰化水平与 EP300 mRNA 表达均无相关性 (分别 $r=-0.08$ 、 -0.25 ; 均 $P > 0.05$); 与 CBP mRNA 表达亦均无相关性 (分别 $r=-0.08$ 、 -0.19 ; 均 $P > 0.05$)。

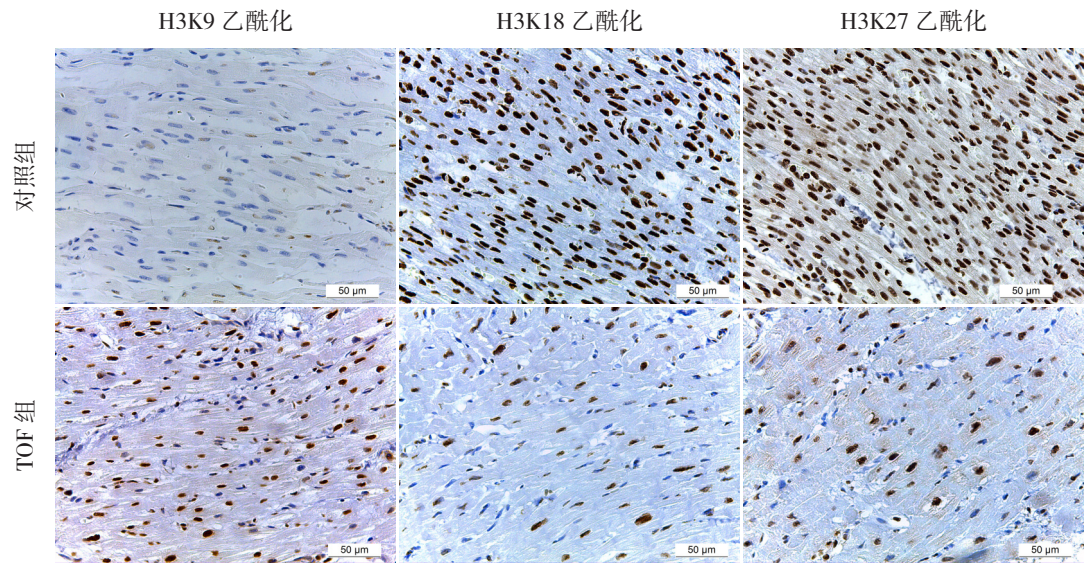


图 1 法洛四联症患儿心肌组蛋白乙酰化水平的免疫组化检测结果（苏木素染色，×400） TOF 组 H3K9 乙酰化水平较对照组明显升高；而 H3K18 和 H3K27 乙酰化水平均较对照组明显降低。乙酰化修饰主要位于核内，棕褐色颗粒为阳性表达。

表 2 两组组蛋白乙酰转移酶 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	EP300	CBP	MOZ	TIP60
对照组	$0.74 \pm 0.31(n=16)$	$0.82 \pm 0.31(n=15)$	$1.31 \pm 0.56(n=17)$	$0.40 \pm 0.28(n=9)$
TOF 组	$0.98 \pm 0.37(n=45)$	$1.17 \pm 0.71(n=46)$	$1.65 \pm 2.88(n=37)$	$0.36 \pm 0.32(n=24)$
<i>t</i> 值	2.378	2.473	0.477	0.372
<i>P</i> 值	0.025	0.017	0.634	0.712

表 3 两组组蛋白去乙酰化酶 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC11
对照组	$1.0 \pm 0.5(n=7)$	$1.5 \pm 1.7(n=8)$	$1.6 \pm 1.4(n=6)$	$0.7 \pm 0.4(n=5)$	$1.4 \pm 1.0(n=6)$	$1.0 \pm 0.5(n=5)$
TOF 组	$1.1 \pm 0.9(n=20)$	$1.4 \pm 0.8(n=23)$	$1.7 \pm 1.3(n=24)$	$0.8 \pm 0.7(n=25)$	$2.0 \pm 2.0(n=24)$	$0.9 \pm 0.5(n=25)$
<i>t</i> 值	0.888	0.322	0.131	0.446	0.670	0.077
<i>P</i> 值	0.383	0.750	0.897	0.645	0.508	0.939

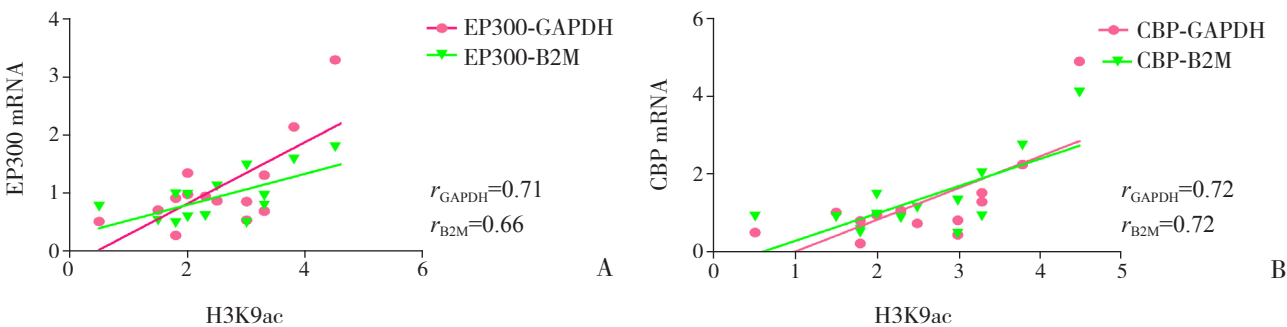


图 2 组蛋白 H3K9 乙酰化水平与 EP300 mRNA(A)和 CBP mRNA(B)表达水平的 Pearson 相关分析 ($n=14$)

3 讨论

目前认为，大多数先心病是多基因疾病，受遗传因素和环境因素共同影响。随着对基因组层

面研究的不断深入，人们发现基因变异并不能完全解释 TOF 的发生。因此，受环境调控的表观遗传改变可能是 TOF 发病的重要影响因素^[11-12]。
组蛋白乙酰化是重要的表观遗传调控之一，

在胚胎发育过程中起着重要作用^[13]。本研究发现TOF患儿的组蛋白乙酰化状态与对照组有差异,在选定的3个位点中,H3K9乙酰化较对照组明显升高,而H3K18及H3K27乙酰化较对照组显著降低。乙酰化状态的改变主要受HATs及HDACs的调控,因此,本研究进一步测定了4个HATs和6个HDACs在TOF患儿流出道心肌内mRNA表达情况,发现EP300和CBP mRNA表达升高,而且EP300和CBP mRNA表达与H3K9乙酰化均呈高度线性正相关,提示H3K9乙酰化程度可能受到EP300和CBP的调控^[7]。但本研究未发现能够解释H3K18和H3K27乙酰化降低的原因,需要进一步的实验研究。

尽管有文献报道HDACs与心脏的发育密切相关^[14-15],但本研究未在TOF患儿右室流出道心肌发现HDACs表达变化,HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5和HDAC11 mRNA表达与对照组相比差异均无统计学意义,原因可能有以下三个方面。一是HDACs表达具有时空特点,出生后的表达情况并不能完全反映胚胎发育期的表达情况^[16-17];二是HDACs易受外界环境因素和体内环境因素(缺氧,酸中毒等)的影响,出生后TOF一系列的血循环变化及外界环境的改变可能会引起HDACs的表达变化,掩盖了胚胎发育期的异常^[18];三是酶的调控受量和活性这两方面影响,而本研究只检测了量的变化,未检测活性的改变。

本研究存在两个重要问题尚需深入研究加以解决。首先,本研究对象是出生后的TOF患儿心肌组织,是否真实的反映胚胎发育时期的表达异常,目前无法判断,需要在胎儿TOF心肌中进一步验证;其次,由于TOF患儿出生后血液循环发生变化,机体内环境改变,是否会影响EP300和CBP mRNA的表达,或者说EP300和CBP mRNA表达改变是TOF发生的“因”还是“果”,这一点目前难以判断,需要进一步在细胞实验中验证EP300和CBP对心肌分化、增殖、迁移等的影响。而这两个问题都是研究胚胎发育共同的难点。虽然人们尚无法完全还原胚胎发育时期的情况,但通过检测出生后患儿心肌组织的相关基因表达水平可以在一定程度上反映胚胎发育时期的情况,具有重要的参考作用。本研究结果提示EP300和CBP可能是通过调控H3K9乙酰化状态影响心脏发育,这可能是TOF发病的重要机制之一,为进一步探讨组蛋白乙酰化与TOF发病的关系提供了重要的参考资料。

[参 考 文 献]

- [1] Hoffman JJ, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [2] 吴瑶. 法洛四联症患儿Cx43基因序列分析及其表达和调控机制的研究[D]. 复旦大学, 2012.
- [3] 张婧, 马晓静, 王慧君, 马端, 黄国英. 法洛四联症患儿类视黄酸受体 α 基因启动子区序列分析[J]. *中国循证儿科杂志*, 2013, 8(2): 105-109.
- [4] 具钊汝. 法洛四联症患儿HIRA基因的表达及其调控机制的初步研究[D]. 复旦大学, 2012.
- [5] 盛伟, 马端. 组蛋白赖氨酸甲基化修饰与先天性心脏病研究进展[J]. *遗传*, 2010, 32(7): 650-655.
- [6] 徐君, 王慧君, 黄国英. 组蛋白乙酰化在先天性心脏病发病中的作用[J]. *中华儿科杂志*, 2013, 51(7): 552-554.
- [7] Sun H, Yang X, Zhu J, Lv T, Chen Y, Chen G, et al. Inhibition of p300-HAT results in a reduced histone acetylation and down-regulation of gene expression in cardiac myocytes[J]. *Life Sci*, 2010, 87(23-26): 707-714.
- [8] Voss AK, Vanyai HK, Collin C, Dixon MP, McLennan BN, Scambler P, et al. MOZ regulates the Tbx1 locus, and Moz mutation partially phenocopies DiGeorge syndrome[J]. *Dev Cell*, 2012, 23(3): 652-663.
- [9] Singh N, Trivedi CM, Lu M, Mullican SE, Lazar MA, Epstein JA. Histone deacetylase 3 regulates smooth muscle differentiation in neural crest cells and development of the cardiac outflow tract[J]. *Circ Res*, 2011, 109(11): 1240-1249.
- [10] Wakefield L, Cornish V, Broackes-Carter F, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase 2 expression in the developing heart[J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(5): 583-592.
- [11] Vallaster M, Vallaster CD, Wu SM. Epigenetic mechanisms in cardiac development and disease[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(1): 92-102.
- [12] Van Weerd JH, Koshiba-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK. Epigenetic factors and cardiac development[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2): 203-211.
- [13] 刘晓梅, 张海兰, 宋薇薇, 焦伊胜, 卢岩. 宫内生长受限大鼠肝脏组蛋白H3乙酰化的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 9(11): 753-756.
- [14] Kim YS, Kim MJ, Koo TH, Kim JD, Koun S, Ham HJ. Histone deacetylase is required for the activation of Wnt/beta-catenin signaling crucial for heart valve formation in zebrafish embryos[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(1): 140-146.
- [15] Trivedi CM, Lu MM, Wang Q, Epstein JA. Transgenic overexpression of Hdac3 in the heart produces increased postnatal cardiac myocyte proliferation but does not induce hypertrophy[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(39): 26484-26489.
- [16] Chen G, Zhu J, Lv T, Wu G, Sun H, Huang X, et al. Spatiotemporal expression of histone acetyltransferases, p300 and CBP, in developing embryonic hearts[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 24.
- [17] 陈国珍, 田杰, 朱静, 吴晓云, 吴刚, 孙慧超. 小鼠心脏发育中组蛋白乙酰化酶GCN5和PCAF的时空表达特征[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2009, 3(18): 273-278.
- [18] Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, et al. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships[J]. *Hum Genet*, 2012, 131(10): 1565-1589.

(本文编辑: 万静)