

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.011

GATA4 基因 H435Y 位点突变对小鼠心功能的影响 *

方 涛 陈名武[△] 张 慧 张 甜 张晓光 朱昂昂

(安徽医科大学附属医院 安徽 合肥 230001)

摘要 目的:研究 GATA4 基因 H435Y 位点突变对小鼠心功能的影响以及可能机制。**方法:**随机选取野生型(WT)小鼠和 GATA4 基因 H435Y 位点突变(Gata4 H435Y)小鼠各 6 只,检测和比较两组小鼠的心功能和心脏重量/体重比,应用 Masson 染色观察小鼠心肌组织形态,实时定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)分别检测心肌组织中 Gata4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggrecan 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**与 WT 组小鼠相比,GATA4 H435Y 组小鼠左心室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS)降低($P<0.05$),左心室收缩末期径(LVIDs)增大($P<0.05$)。两组组小鼠的心脏重量比较差异无统计学意义($P>0.05$),GATA4 H435Y 组小鼠体重较 WT 组小鼠显著减轻、心重/体重比明显减小($P<0.05$)。Masson 染色结果显示两组小鼠心肌纤维无明显差异,但 WT 组小鼠心肌胶原纤维染色较深。与 WT 组小鼠相比较,GATA4 H435Y 组小鼠心肌组织中 GATA4、Scleraxis 和 Sox9 的 mRNA 及蛋白明显表达下降($P<0.05$),Aggrecan 和 TenascinmRNA 和蛋白表达均无明显统计学差异($p>0.05$)。**结论:**GATA4 基因 H435Y 位点突变可能通过降低 GATA4 及下游基因表达,影响心肌细胞外基质基因的表达,进而损害小鼠的心功能。

关键词:GATA4; 突变; 心功能; 细胞外基质

中图分类号:R-33; Q132.7; R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)05-846-05

Effect of GATA4 Gene H435Y Mutation on the Heart Function of Mice*

FANG Tao, CHEN Ming-wu[△], ZHANG Hui, ZHANG Tian, ZHANG Xiao-guang, ZHU Ang-ang

(Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei, Anhui, 230001, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of GATA4 gene H435Y mutation on the heart function of mice and its possible mechanisms. **Methods:** Our research included in 2 groups: Wild type (WT) mice group and Gata4 H435Y mutant(Gata4 H435Y) mice group, 6 mice in each group. The heart function and the ratio of heart weight to body weight (HW/BW) were compared between 2 groups; the myocardial morphology was observed by Masson staining; the mRNA and protein expressions of GATA4, Sox9, Scleraxis, Tenascin and Aggrecan were determined by RT-PCR and Western blot analysis. **Results:** Compared with the WT mice, GATA4 H435Y mice group showed decreased LVEF, LV fraction shortening and increased left ventricular internal diameter at end-systole (LVESD)($P<0.05$). The BW and ratio of HW/BW of GATA4 H435Y mice were obviously lower ($P<0.05$), the heart weight showed no significant difference between 2 groups ($P>0.05$). Masson staining showed that there was no significant difference in the myocardial fibers between the two groups, but the collagen fibers of myocardium in WT group were deeper. The mRNA and protein expressions of GATA4, Sox9 and Scleraxis were decreased in GATA4 H435Y mice ($P<0.05$), Tenascin and Aggrecan showed no significant difference between 2 groups($P>0.05$). **Conclusion:** GATA4 gene H435Y mutation may affect the expression of extracellular matrix genes in cardiac muscle by reducing the expression of GATA4 and downstream genes, thereby impairing the cardiac function of mice.

Key words: Gata4; Mutation; Heart function; Extracellular matrix

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q132.7; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-846-05

前言

GATA4 基因含有两个锌指结构(Cys-X2-Cys-x17-Cys-X2-Cys),是一个高度保守的 DNA 结合域,共编码 442 个氨基酸,是 GATA 转录因子家族^[1]的一员。研究表明 GATA4 基因是心脏发生发育过程中非常重要的转录因子,其首先在心脏前期的中胚层表达,随后在心内膜和心肌中表达,参与了心脏的正常

发育及心脏发生后对心原细胞在心脏的特异分化和迁移^[2-4]。正常表达水平的 GATA4 基因在心脏环化、心房和心室发育、房室瓣形成以及传导系统的维持等过程中起着关键的作用^[5]。本课题组前期研究显示体外实验中 GATA4 H436Y 突变可能在人类心内膜发育的起着一定的作用^[6]。因此,我们建立了 Gata4 基因 H435Y 突变小鼠模型^[7],通过观察小鼠心脏发育情况及 Gata4 突变对 Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggrecan 基因

* 基金项目:安徽省自然科学基金项目(1608085MH196)

作者简介:方涛,硕士研究生, E-mail: zhoujianhui488@163.com

[△] 通讯作者:陈名武,主任医师

(收稿日期:2018-12-08 接受日期:2018-12-31)

表达量的影响,初步探讨了 GATA4 基因在小鼠心脏发育过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物的饲养及试剂

实验动物:C57BL/6 野生型小鼠购买于安徽医科大学附属医院中心试验室,GATA4 基因 H435Y 位点突变小鼠由课题组前期构建完成^[7]。所有实验用小鼠均饲养于安徽医科大学附属医院中心试验室动物房。研究用的小鼠为 8~12 周龄小鼠。所有动物实验均遵守《实验动物管理条例》及相关的实验动物伦理规则。

主要试剂:Masson 染色试剂盒购于碧云天生物技术研究所以, RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司(USA),反转录试剂盒和实时定量反转录聚合酶链式反应试剂盒购于 Takara 公司(Japan),Nu-PAGE 预制胶 Bis-Tris 4%~12%购于 Invitrogen 公司(USA),增强型化学发光免疫印迹底物购于 Thermo Fisher 公司(USA)。主要仪器:小动物高频超声系统 Vevo2100 购自 Visual Sonic 公司(Canada),小动物呼吸麻醉机购自 Matrx 公司(USA),电子天秤购于 Satorious 公司(Germany),PCR 仪购自 Bio-Rad 公司(USA),电泳槽和转膜仪购于 Invitrogen 公司(USA),化学发光成像仪购于北京赛智创业科技有限公司。

1.2 超声评估小鼠心功能

WT 组小鼠、Gata4 H435Y 组小鼠各随机抽取 6 只小鼠,放置于预充有 2%异氟烷的密闭箱中,进行麻醉。麻醉好的小鼠取左侧卧位,平放于检测台上,使用 Vevo 2100 高频小动物超声检测系统行心脏超声检查,观察比较两组小鼠心脏结构及瓣膜发育情况,测量左心室舒张末期内径(left ventricular internal diameter at end-diastole, LVIDd)和左心室收缩末期内径(left ven-

tricular internal diameter at end-systolic, LVIDs),并计算小鼠的左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.3 小鼠体重、心脏重量测量

使用电子天秤对每只小鼠进行准确称量体重。处死麻醉小鼠,迅速取出心脏并置于冰浴的磷酸盐缓冲液(PBS)中,用镊子轻柔挤出心腔内残余血液,剪刀除去心脏大血管起始部,用干净滤纸吸干心脏表面液体,使用分析天平精确称量心脏重量并记录。

1.4 Masson 染色观察小鼠心肌组织的病理形态

小鼠心脏称重后,放入多聚甲醛溶液中固定,脱水,石蜡切片,石蜡切片脱蜡至水,置于重铬酸盐-醋酸液处理 40 min,水洗后染苏木精 10 min,蒸馏水充分冲洗;2%的盐酸酒精分化,用水冲洗;1%丽春红酸性品红液中染 15 min,蒸馏水冲洗;1%磷钼酸水溶液处理 5 min,接着用 2%的亮绿液染色 8 min;1%醋酸液分色 2~3 次,脱水、透明、中性树胶封片。电镜下观察染色结果并拍照记录。

1.5 qRT-PCR 检测小鼠心肌组织中基因表达水平

PCR 反应采用两步法,取适量小鼠心肌组织,用组织 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,根据 PrimeScript 逆转录试剂盒说明书进行总 cDNA 合成。逆转录反应条件:37℃、15 min,85℃、5 s,4℃保温,在 Gene Amp PCR System9700 上进行。应用 Applied Biosystems7500 型荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应,扩增条件:95℃、30 s,95℃、5 s,60℃、3 s,共 40 个循环。采用 RT-PCR 试剂盒检测 Gata4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggrecan 基因表达水平。所有引物均由合肥海拉生物公司合成,引物序列如表 1 所示,选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参基因。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Primer	Forward5'-3'	Reverse5'-3'
Gata4	CCCTCCATCCACCCTGTCTT	GGCTGTTCCAAGAGTCCTGC
Sox9	GCACTGGGAACAACCCGTCTA	AGGATCATCTCGGCCATCGT
Scleraxis	GACAGCGATTGCGAGTTAGGA	GCCCAGCTCAGGTCCAAGGT
Tenascin	ATGCGTGGAGAATGAGTGCG	AGCAGGTGCCATTGATGCAG
Aggrecan	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
GAPDH	TGTTCCAATATGATTCCACCCA	TCCTGGAAGATGGTGATGGG

1.6 Western Blot 方法检测小鼠心肌组织中相关蛋白表达水平

取适量心肌组织(50 mg)提取总蛋白,各取等量样品上样,80 V 电压下电泳 30 min,待样品进入分离胶后用 120 V 电压电泳 1.5 h。通过转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上。取下 PVDF 膜,置于 5%脱脂牛奶中室温封闭 1 h,分别加入一抗和内参,4℃孵育过夜。用 PBST 液洗膜 3~4 次,每次 15 min,加入与一抗相对应的二抗孵育 2 h,用 TBST 液洗膜 3 次,每次 15 min,加入适量显影剂。用 Image J 软件分析各条带灰度值,以目的条带与 GAPDH 的灰度值比值反映蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

所有实验均重复 3 次,数据应用 Graph Pad Prism 5 统计软件进行分析,并用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用独立样本 t 检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠心功能的比较

应用超声系统对两组小鼠心功能进行评估,结果显示(表 2,图 1):两组小鼠心脏瓣膜等结构未见明显异常;GATA4 H435Y 组小鼠的 LVEF 和 LVFS 均低于 WT 组小鼠($P < 0.05$),LVIDs 比 WT 组小鼠高($P < 0.05$),LVIDd 比 WT 组小鼠稍高,但两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 两组小鼠心功能指标比较

Table 2 Comparison of the cardiac function indexes between two groups of mice(*P<0.05)

Groups	LVEF(%)*	LVFS(%)*	LIVDs(mm)*	LIVDd(mm)
WT group(n=6)	62.41± 7.15	38.43± 4.13	2.62± 0.43	3.95± 0.55
GATA4 H435Y group(n=6)	58.74± 5.68	29.84± 6.22	3.07± 0.39	4.16± 0.47

2.2 两组小鼠的体重、心脏重量及心重 / 体重比的比较

与 WT 组小鼠相比(表 3),GATA4 H435Y 组小鼠的体重显

著减轻(P<0.05),心脏重量减轻,但差异无统计学意义(P>0.05),心重 / 体重比明显下降(P<0.05)。

表 3 两组小鼠的体重、心脏重量及心重 / 体重比的比较(*P<0.05)

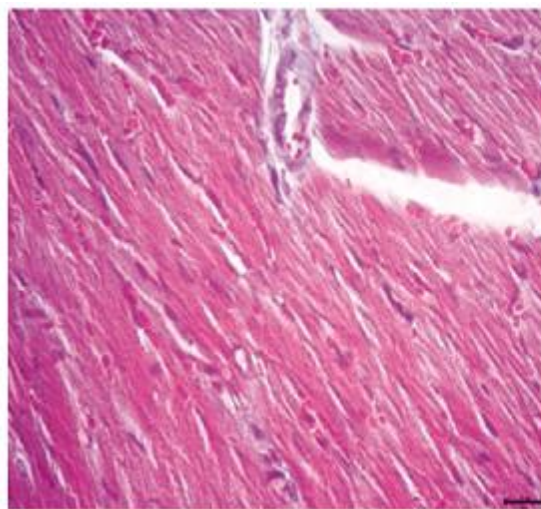
Table 3 Comparison of the body weigh, heart weigh and heart weigh/body weigh ratio between two groups of mice(*P<0.05)

Groups	Body weigh(g)	Heart weigh(mg)	Heart weigh/Body weigh ratio
WT mice group(n=6)	26.41± 0.43	122.33± 6.15	4.67± 0.24
GATA4 H435Y mice group(n=6)	23.65± 0.57*	108.35± 5.39	4.12± 0.18*

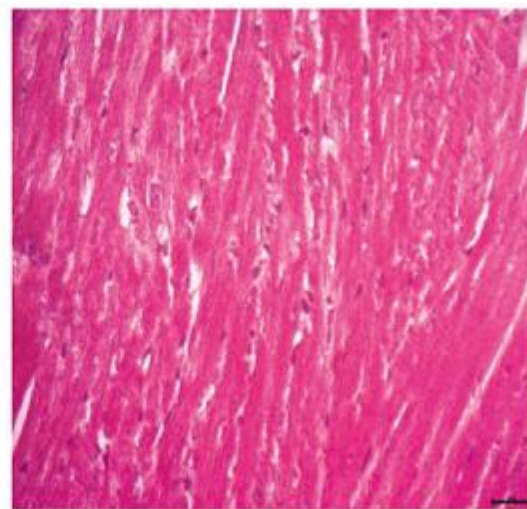
2.3 两组小鼠心肌组织 Masson 染色比较

两组小鼠心肌组织切片行 Masson 染色显示(图 1),两组小鼠心肌细胞(红色)排列整齐、致密、心肌肌束形态完整,无明显

差异;与 WT 组小鼠相比,GATA4 H435Y 组小鼠心肌胶原纤维(蓝色)染色面积减少、程度变浅。



WT mice group



GATA4 H435Y mice group

图 1 两组小鼠心肌组织 Masson 染色比较(放大倍数为 400 倍)

Fig.1 Cardiac tissue morphology in two groups of mice observed by Masson staining(magnify 400 times)

2.4 两组小鼠心肌组织 GATA4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggrecan mRNA 表达的比较

如图 2 所示,GATA4 H435Y 组小鼠的 GATA4、Sox9 和 Scleraxis 基因表达水平均低于 WT 组小鼠(P<0.05),Tenascin 和 Aggrecan 基因表达水平有所下降,但两组差异无统计学意义(P>0.05)。

2.5 两组小鼠心肌组织中 GATA4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggrecan 蛋白表达的比较

如图 3、图 4 所示,GATA4 H435Y 组小鼠的 GATA4、Sox9 和 Scleraxis 蛋白表达均低于 WT 组小鼠 (P<0.05),而两组 Tenascin 和 Aggrecan 蛋白表达比较无明显差异(P>0.05)。

3 讨论

细胞外基质(extracellular matrix,ECM)对于心脏正常结构

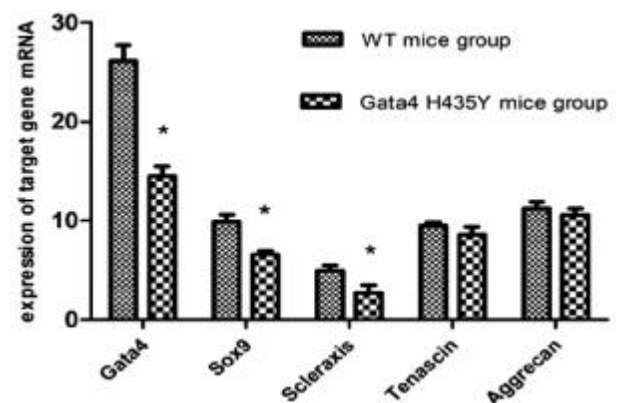


图 2 两组小鼠 GATA4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggrecan mRNA 的表达比较(*P<0.05)

Fig.2 Comparison of the mRNA expression of GATA4, Sox9, Scleraxis, Tenascin and Aggrecan between two groups of mice(*P<0.05)

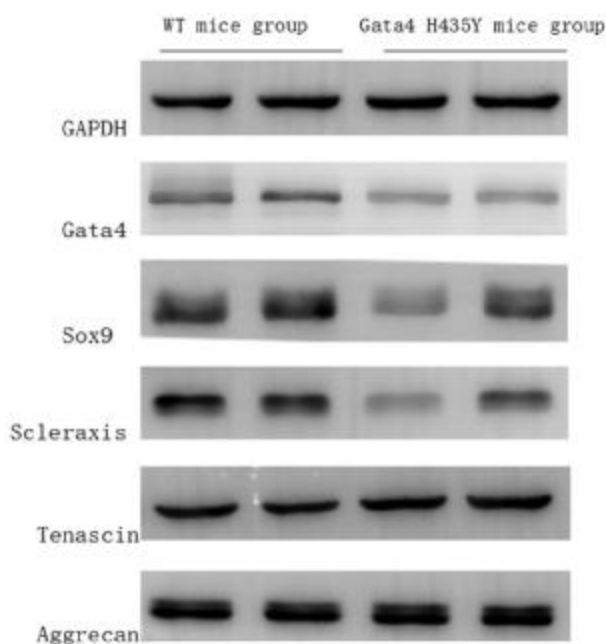


图3 Western blot 检测两组小鼠心肌组织中 GATA4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggreacan 蛋白表达

Fig.3 The expression of GATA4, Sox9, Scleraxis, Tenascin and Aggreacan protein between two groups of mice detected by western blot

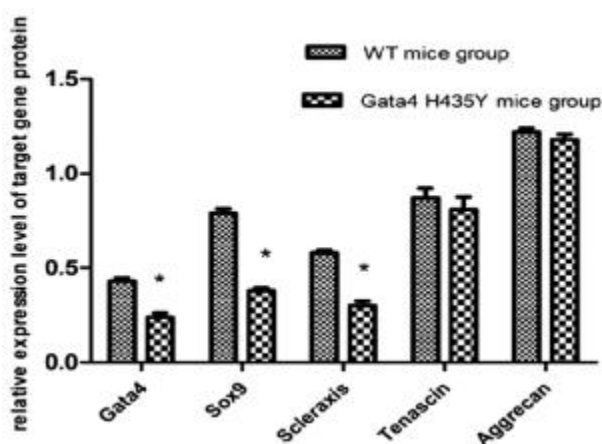


图4 两组小鼠心肌组织中 GATA4、Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggreacan 蛋白表达比较

Fig.4 Comparison of the expression of GATA4, Sox9, Scleraxis, Tenascin and Aggreacan protein between two groups of mice

的发育及功能的形成起着非常重要的作用^[8,9]。Sox9 基因在胚胎发生、器官发育、细胞分化等过程中起着关键作用^[10-12]。动物实验研究显示 Sox9 参与心脏瓣膜和心内膜垫(Endocardial cushion, EC) 的发育, Sox9 基因敲除可导致小鼠因心内膜垫发育不全而胎死腹中, Sox9 基因下调可影响细胞外基质沉积过程, 并导致胶原纤维含量下降^[13-17]。因此, Sox9 基因是心脏正常发育过程中非常重要的基因。Scleraxis 是一个基本的螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH)结构转录因子, 表达于肌腱、韧带等组织, 并在心脏发育过程中起着重要作用^[18,19]。研究显示 Scleraxis 控制广泛选择的心肌 ECM 基因的表达, 可能是 ECM 基因调控的主体^[20]。Scleraxis 可以通过调节下游基质金属蛋白酶(MMPs)的表达来影响基质的结构^[21], 基因敲除小鼠模型在传力肌腱和心脏瓣膜形态上表现出明显的缺陷, 这些改变主

要归因于 Scleraxis 可以诱导心肌成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化, 基因缺失后出现心肌成纤维细胞数量的减少、心肌纤维化程度的下降和 I 型胶原的丢失或其他胶原蛋白的表达改变^[22]。

GATA4 是维持心脏发育的关键性转录因子, 在心脏形态发生中发挥重要作用^[23-26]。GATA4 调控心脏发育的机制十分复杂, 通常和其他多种转录因子相互作用来共同发挥调节作用^[27]。目前研究表明 GATA4 基因参与心脏发育的多个环节, 如调控心肌细胞分化、心脏形态发育、心肌细胞的存活和参与心脏功能的维持^[28-30]。课题组通过前期体外实验研究发现 Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggreacan 可能是 GATA4 下游靶基因, 并且 GATA4 可能是通过调节转录因子 Sox9、Scleraxis、Tenascin 和 Aggreacan 在 ECD 形成中起着一定的作用^[6]。在此基础之上, 我们建立了 GATA4 基因 H435Y 位点突变小鼠模型, 进一步明确了 GATA4 基因 H435Y 位点突变小鼠的表现型, 并探究了在体内实验中 Gata4 基因 H435Y 位点对自身及下游靶基因的影响。本实验研究结果显示与野生型小鼠对比, GATA4 H435Y 组小鼠心功能受损; 体重、心脏重量降低, 心重/体重比减小; Masson 染色结果显示突变组小鼠胶原纤维含量较野生小鼠减少, 心肌组织中 Gata4、Sox9 和 Scleraxis 表达减少, 提示 GATA4 H435Y 突变使 GATA4 基因自身表达水平下降, 并可能通过转录激活作用导致下游靶基因 Sox9 和 Scleraxis 表达量下降, 影响心肌 ECM 基因的表达, 导致心肌组织胶原纤维减少, 最终引起小鼠心功能受损、心脏发育受到影响。

心脏发育是一个非常复杂的过程, 涉及多个转录因子的调控。本研究结果表明 GATA4 基因在心脏的发育和功能的维持中起着非常重要的作用, 为 GATA4 基因突变导致的心脏发育障碍提供了新的研究思路。

参考文献(References)

- [1] Reamon-Buettner Stella Marie, Cho Si-Hyen, Borlak Juergen, Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD) [J]. BMC Med Genet, 2007, 8(1): 1-12
- [2] Ang Y S, Rivas R N, Ribeiro A J S, et al. Disease Model of GATA4 Mutation Reveals Transcription Factor Cooperativity in Human Cardiogenesis[J]. Cell, 2016, 167(7): 1734-1749
- [3] Peng T, Wang L, Zhou S F, et al. Mutations of the GATA4 and NKX2.5 genes in Chinese pediatric patients with non-familial congenital heart disease[J]. Genetica, 2010, 138(11-12): 1231-1240
- [4] Dixit Ritu, Narasimhan Chitra, Balekundri Vijayalakshmi I, et al. Functionally significant, novel GATA4 variants are frequently associated with Tetralogy of Fallot[J]. Hum Mutat, 2018, 39(12): 1957-1972
- [5] Guo Xiao, Qian Yan-yan, Xiao De-yong, et al. Low frequency variant of ZFPM2 contributed to conotruncal abnormality via affecting GATA4 transcriptional regulation [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Pediatrics, 2017, 12(6): 457-462
- [6] Zhang Yan-li, Chen Ming-wu, Chen Ye, et al. Experimental studies on the role of GATA4 in the endocardial cushions development [J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2015, 43(5): 437-441
- [7] Zhang Hui, Chen Ming-wu, Fang Tao, et al. Establishment and verification of a mouse model of gene H435Y mutation [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2018, 38(10): 1245-1249

- [8] Frangogiannis Nikolaos G. Fibroblasts and the extracellular matrix in right ventricular disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(12): 1453-1464
- [9] Mouton AJ, Ma Y, Rivera Gonzalez OJ, et al. Fibroblast polarization over the myocardial infarction time continuum shifts roles from inflammation to angiogenesis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114: 6[Epub ahead of print]
- [10] Symon Aleisha, Harley Vincent. SOX9: A genomic view of tissue specific expression and action [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 87 (10): 18-22
- [11] Menon V. The Genetic Regulation of Aortic Valve Development and Calcific Disease [J]. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2018, 5: 162[Epub ahead of print]
- [12] Gawdzik JC, Yue MS, Martin NR, et al. Sox9b is required in cardiomyocytes for cardiac morphogenesis and function[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 13906-13910
- [13] Akiyama H, Chaboissier M C, Behringer R R, et al. Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(17): 6502-6507
- [14] Yue C, Ji C, Zhang H, et al. Protective effects of folic acid on PM25-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish embryos by targeting AhR and Wnt/ β -catenin signal pathways [J]. *Environmental toxicology*, 2017, 32(10): 2316-2322
- [15] Sanchezcastro M, Gordon C T, Petit F, et al. Congenital heart defects in patients with deletions upstream of SOX9 [J]. *Human Mutation*, 2013, 34(12): 1628-1631
- [16] Farrar E J, Pramila V, Richards J M, et al. Valve interstitial cell tensional homeostasis directs calcification and extracellular matrix remodeling processes via RhoA signaling [J]. *Biomaterials*, 2016, 105 (7): 25-37
- [17] Augstein A, Mierke J, Poitz D M, et al. Sox9 is increased in arterial plaque and stenosis, associated with synthetic phenotype of vascular smooth muscle cells and causes alterations in extracellular matrix and calcification [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2018[Epub ahead of print]
- [18] Barnette Damien N, Hulin Alexia, Ahmed A S Ishtiaq, et al. Tgf β -Smad and MAPK signaling mediate scleraxis and proteoglycan expression in heart valves[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 65(2): 137-146
- [19] Levay AK, Peacock JD, Lu Y, et al. Scleraxis is required for cell lineage differentiation and extracellular matrix remodeling during murine heart valve formation in vivo [J]. *Circ Res*, 2008, 103 (9): 948-956
- [20] Lincoln Joy. The cardiac matrix revolution: Post-translational modification of Scleraxis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 93(4): 106-107
- [21] Nagalingam Raghu S, Safi Hamza A, Al-Hattab Danah S, et al. Regulation of cardiac fibroblast MMP2 gene expression by scleraxis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 120(5): 64-73
- [22] Bagchi Rushita A, Lin Justin, Wang Ryan, et al. Regulation of fibronectin gene expression in cardiac fibroblasts by scleraxis [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(2): 381-391
- [23] Malek M M, Kattih B, Grund A, et al. The transcription factor GATA4 promotes myocardial regeneration in neonatal mice [J]. *Embo Molecular Medicine*, 2017, 9(2): 265-279
- [24] Tong YF. Mutations of NKX25 and GATA4 genes in the development of congenital heart disease[J]. *Gene*, 2016, 588(1): 86-94
- [25] Chen LT, Yang TB, Wang TT, et al. Association of single nucleotide polymorphisms of transcription factors with congenital heart diseases in the Chinese population: a Meta analysis[J]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2018, 20(6): 490-496
- [26] Yin J, Qian J, Dai G, et al. Search of Somatic Mutations of NKX2-5 and GATA4 Genes in Chinese Patients with Sporadic Congenital Heart Disease[J]. *Pediatr Cardiol*, 2018, 10[Epub ahead of print]
- [27] Kinnunen Sini, Valimäki Mika, Tölli Marja, et al. Nuclear Receptor-Like Structure and Interaction of Congenital Heart Disease-Associated Factors GATA4 and NKX2-5 [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(12): 144-145
- [28] Yang L, Lixiang X, Center M. Post-translational modification of GATA-4 in heart development and its function exertion[J]. *Chemistry of Life*, 2016, 36(1): 97-104
- [29] Gordon JW. Regulation of cardiac myocyte cell death and differentiation by myocardin[J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 2018, 437 (2): 119-131
- [30] Katanasaka Y, Suzuki H, Sunagawa Y, et al. Regulation of Cardiac Transcription Factor GATA4 by Post-Translational Modification in Cardiomyocyte Hypertrophy and Heart Failure [J]. *International heart journal*, 2016, 57(6): 672-675