

· 综述 ·

NKx2.5 基因的生物学特征及在心脏发育中作用机制的研究进展

朱业^{1,2}, 顾翔^{1,2*}

(¹ 扬州大学临床医学院内科学系, 江苏 扬州 225001; ² 苏北人民医院心血管内科, 江苏 扬州 225001)

【摘要】 NKx2.5 基因是目前发现最早的与心脏发育和成熟相关的转录因子, 会影响胚胎心脏发育异常, 最终可能导致异常的心脏结构和传导功能受阻, 甚至死亡。本文综述了 NKx2.5 基因的生物学特征及其在心脏发育中的作用机制, NKx2.5 基因在心脏发育过程中与其他转录因子发挥协同作用, 共同促进心肌细胞的发育。早期进行 NKx2.5 基因检测将有助于筛查遗传性先天性心脏病, 预防心动过缓或过速导致的心源性猝死。

【关键词】 心脏发育; 转录因子; 基因突变

【中图分类号】 R541.1 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2022.04.065

Biological characteristics of NKx2.5 and mechanism of its roles in cardiac development

ZHU Ye^{1,2}, GU Xiang^{1,2*}

(¹ Faculty of Internal Medicine, Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China;

² Department of Cardiovascular Diseases, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China)

【Abstract】 NK2 homeobox 5 (NKx2.5) is an earliest transcription factor related to the development and maturation of the heart, which may affect the abnormal development of the embryonic heart, and ultimately lead to the abnormal cardiac structure and conduction function, or even death. In this article, we review the biological characteristics of NKx2.5 and its mechanism of action in cardiac development, and introduce the newly discovered mutations in patients in recent years. The gene acts synergistically with other transcription factors during heart development to promote the development of precursor cardiomyocytes. Early detection of the gene will help to screen hereditary congenital heart disease and prevent sudden cardiac death caused by bradycardia or tachycardia.

【Key words】 cardiac development; transcription factor; genetic mutations

This work was supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81800250).

Corresponding author: GU Xiang, E-mail: guxiang@yzu.edu.cn

近年来研究发现, 哺乳动物心脏发育的过程是由特定的信号分子启动, 组织特异性转录因子在心肌细胞的形成、心前细胞的迁移和分化、心脏瓣膜及房室分隔的发育过程中起着重要作用^[1]。其中 NKx2.5 基因是最早被发现与心脏的发育和成熟有关, 在心脏发育过程中发挥重要作用的转录因子之一。本文综述了 NKx2.5 基因的生物学特征及其在心脏发育中的作用机制。

1 NKx2.5 生物学特征

NKx2.5 基因是 NK 同源核基因家族 NKx2 的成员, 是早期心脏祖细胞分化的标志之一^[2]。NKx2.5

基因定位于人染色体 5q34-35 上, 它在进化过程中高度保守, 常被称为心脏特异性同源盒基因或 CSX 同源基因, 它有两个外显子发挥着重要作用, 互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 全长 1585 bp, 它能编码 324 个氨基酸的蛋白质^[3]。NKx2.5 基因编码蛋白有 4 类高度保守的结构域, 包括 N 端的 TN 结构域、160 个氨基酸组成的同源盒结构域、结构域下游的 NK2-SD 和 C 端含有 GI-RAW 保守的结构域。同源结构域与靶基因中的顺式作用元件序列 (5'-TNAAGTG-3') 的相应序列结合, 启动下游基因的转录。这种蛋白质-DNA 结合的最有意义的氨基酸包括天冬氨酸及赖氨酸等。

收稿日期: 2021-01-11; 接受日期: 2021-07-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81800250)

通信作者: 顾翔, E-mail: guxiang@yzu.edu.cn

NKx2.5 还有一个富含丙氨酸和脯氨酸残基的阻遏结构域,以及富含上述两种氨基酸和天冬氨酸、谷氨酸残基的激活域。它们的变化将引起蛋白质-DNA 间亲和力的改变,影响基因的转录,进而产生相关蛋白的缺陷,形成心脏畸形^[4]。*NKx2.5* 的表达也受 *GATA* 因子和 *SMAD* 蛋白以及 *NKx2.5* 自身的调控等,形成一个完整的自主调节回路。*NKx2.5* 还与其他关键的心脏转录因子联合作用共同促进心肌细胞分化和房室鉴定。

2 *NKx2.5* 在心脏发育中的作用

同源域蛋白 *NKx2.5* 调控心脏发育的多个方面,包括心脏前体细胞和流出道的形成等。*NKx2.5* 基因具有在心脏特异性表达特点,*NKx2.5* 表达最早见于脊椎动物心脏头褶期心肌源性前体细胞,并在心肌细胞分化的各个阶段均持续表达。它涉及房室前体细胞的分化与分离、负责维持正常心脏传导系统和复杂的功能。*NKx2.5* 位于众多心脏结构基因的上游,参与了心脏祖细胞的分化、房室间隔、房室流出道和传导系统的形成,维持了成人心脏的正常结构功能。通过调控它们的表达来调节心脏的发育。如肌钙蛋白 C (cardiac troponin C, cTnC)、心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 以及心脏特异转录因子如 *MLC2V*、*BMP10* 及 *TBX5* 等。

Terada 等^[5] 利用他莫西芬诱导胚胎发育第 12.5 天的 *NKx2.5* 基因敲除,发现小鼠在第 16 天时出现心律失常和结构异常,第 17.5 天时死亡。*NKx2.5* 基因敲除小鼠表现为环化后的血管发育异常和心脏发育滞后,并在心脏完全环化前死亡。既往研究还证实了使用他莫西芬诱导 *NKx2.5* 敲除小鼠,*NKx2.5* 不仅在心脏发育期间发挥关键作用,也在围产期心脏通过调控几个重要基因产物的表达调节心脏的传导和收缩功能^[6]。此外,Kasahara 等^[7] 在 *NKx2.5* 基因的过表达后,出现了房室传导阻滞和心脏结构缺陷等表型。较早有报道 *NKx2.5* 基因过表达导致成人心肌肥厚^[8],由此可见,*NKx2.5* 基因的缺失或过表达均可能对心脏的正常形态、结构和传导系统产生重要影响。

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 是胎儿发育期间,心脏或大血管的异常形态和结构,出生缺陷造成了心脏功能的实际或潜在的影响,为目前婴幼儿死亡的首要原因^[9]。心脏的形成过程依赖精确的基因遗传编排,转录调节因子相互协调,信号通路和染色质重构等。在人类 CHD 患者基因型的研究中发现,*NKx2.5* 等位基因变异可造成房室间隔缺陷、心肌纤维排列异常及心脏传导系统发育异

常等,同时心律失常高于正常的发生率。*NKx2.5* 基因杂合子小鼠可出现进展性的房室传导阻滞,其基因表型与 *NKx2.5* 基因变异的心律失常患者表型一致。

研究表明,心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞分化的多向潜能干细胞均表达 *NKx2.5* 转录因子^[10]。*NKx2.5* 转录因子能促进胚胎干细胞向心肌细胞转化。*NKx2.5* 转录因子表达阳性的转录因子可以抑制心肌细胞纤维化,使心肌细胞及功能处于动态平衡当中。另有研究发现,心肌缺血后,有 *NKx2.5* 表达阳性的干细胞迁移到梗死灶,并且分化为心肌细胞^[11],由此说明心肌中 *NKx2.5* 表达阳性的干细胞具有向心肌细胞分化的潜能。

3 *NKx2.5* 与其他转录因子之间的相互作用

心脏发育需要不同转录因子之间在空间和时间上相互作用来调控下游靶点,而转录因子相互作用发生障碍可能导致各种 CHD 类型^[12]。既往有研究表明,*NKx2.5* 与其他多个转录因子之间存在相互作用^[13]。*NKx2.5* 具有启动子依赖性,而且复杂的顺式调节作用在心肌细胞的基因表达中有重要地位。在 *GATA-4*、*NKx2.5* 基因中互相包含启动二者特异性表达所必需的结合位点,不同转录因子之间的相互作用,共同调节着胚胎心脏表型发育过程中的基因转录^[14]。

NKx2.5 通过同源域与 *GATA-4* 和 *Tbx5* 转录因子在生理上协同作用,其相互作用可避免 CHD 的发生。比如在小鼠心脏传导系统的发育和维持中,*NKx2.5* 功能在转录级联中需要与 *Tbx5* 和 *Id2* 的相互作用。事实上,*NKx2.5* 突变使同源域受到影响,导致了 *GATA4* 和 *Tbx5* 的相互作用明显下降。*GATA-4* 在心脏谱系与 *NKx2.5* 共表达,*GATA-4* 和 *NKx2.5* 相互依存共同发挥作用,在 *NKx2.5* 的远端增强子含有限制性心脏锌指转录因子 *GATA-4* 的高亲和性结合位点,*NKx2.5* 的心脏特异性上游增强子在线性血管和环化的过程中处于活化状态。体外试验表明,*NKx2.5* 基因的表达可以启动心肌的发生,并且在心肌分化过程中激活 *MEF2C* 基因,而 *MEF2C* 基因的表达在启动心肌发生的同时可以上调 *NKx2.5*、*GATA4*、 α -肌动蛋白和主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 的表达,*NKx2.5* 通过与转录因子 *MEF2C* 的直接相互作用控制心室的形成^[15]。另外,*NKx2.5* 的上游转录抑制因子 *Shox2* 的突变会影响其在窦房结中表达,导致妊娠中期胚胎致死率与小鼠严重窦房结发育不良和相关心率异常^[16]。

通过对不同心脏特异性转录因子的基因测序,“受影响”畸形心脏组织的基因经常被发现疾病相

关的突变,在同一患者心脏中未受影响的组织中却未发现这种基因突变,这表明体细胞嵌合体和体细胞起源的突变。许多患者可检测出多个有害突变,而且存在多个转录因子基因突变^[17]。具体地说,常见的心脏畸形与 *NKx2.5* 突变有关的分别是房室传导阻滞、房间隔缺损和室间隔缺损。但是同样的结构异常中也可发现其他转录因子的突变。房间隔缺损与 *GATA4*、*TBX5* 和 *ZIC3* 的突变相关,房室传导阻滞与 *NKx2.5* 和 *TBX5* 突变有关,或者室间隔缺损与 *GATA4* 和 *TBX5* 突变有关。

4 *NKx2.5* 基因突变与心脏病的关系

自 1998 年人类首次在 CHD 患者身上发现 *NKx2.5* 突变,研究者们一直致力于探索 *NKx2.5* 编码区与疾病相关的其他序列突变^[18]。同一种 CHD 可存在不同的 *NKx2.5* 基因突变,而相同的 *NKx2.5* 基因突变可以有不同的 CHD 表现型。不同的心脏畸形甚至可引起相同的突变,由此证明了修饰基因和表观遗传效应导致疾病有不同的表现。

据报道,全球迄今至少有 50 种 *NKx2.5* 基因存在错义突变,国外存在 4% 的突变率,相对而言我国 CHD 患者 *NKx2.5* 基因突变则较少。在散发型单纯性 CHD 患者中,孙森等^[19] 研究是国内最早发现的见于散发单纯性 CHD 患者的 *NKx2.5* 基因突变,且不同于国外报道的已知突变位点。在 58 例 CHD 患者中发现碱基缺失突变 p. Pro283Gln 位于 *NKx2.5* 的第 2 个螺旋,严重影响 DNA 序列与蛋白质结合的方式和程度,导致转录过程失控,下游基因表达异常,相关蛋白结构缺陷从而导致 CHD 的发生。此外,国外学者研究发现在各种 CHD 患者中都存在 *NKx2.5* 外显子 1 基因突变^[20]。而国内研究中却并未发现 *NKx2.5* 基因的外显子 1 发生突变^[21]。由此可见,*NKx2.5* 基因突变位点的检出还存在明显地域和种族差异。随着 *NKx2.5* 基因结构和表达的阐明,更多的研究已转向 *NKx2.5* 基因功能及调节作用机制。CHD 患者中有 3% 存在 *NKx2.5* 基因突变,这些 CHD 包括房室传导异常的房室间隔缺损、室间隔缺损、右室双出口、三尖瓣畸形、法洛四联症以及椎干心脏畸形等^[22]。超过一半的 *NKx2.5* 突变是家族性的,家系中也存在特定的突变遗传。Rochais 等^[23] 对 230 例法洛四联症患者的 *NKx2.5* 基因进行检测,经遗传分析发现突变频率为 0.9%。*NKx2.5* 是目前发现的第 1 个与家族性房间隔缺损有关的心脏转录因子,目前共发现家族性房间隔缺损研究中有 33 个突变,散发的房间隔缺损研究中有 8 个突变^[24]。

事实上一直以来,*NKx2.5* 突变并不是 CHD 所独有。*NKx2.5* 突变在甲状腺发育不良以及未发现心脏异常的患者中均有发现,从而提示了 *NKx2.5* 在器官发生和病理生理发展中均发挥了广泛作用^[25]。正如 Simmons 等^[26] 认为生殖系突变可能并不与发育中的胚胎的存活相一致,可能的原因为很多控制心脏发育的基因在其他器官系统发展中也起着关键作用,在任何情况下不太可能仅仅引起 CHD 而已。总而言之,单个种系 *NKx2.5* 突变作为引起疾病的直接原因或是单靠孟德尔遗传可能不足以解释疾病的发病机制^[27]。

NKx2.5 的突变也存在于扩张型心肌病或室性心律失常的患者,而且最终可能导致心源性猝死^[28]。15% 的患者发生心源性猝死有遗传性房间隔缺损和房室传导阻滞^[29]。房间隔缺损和心源性猝死家族有 44% 存在 *NKx2.5* 突变。但是到目前为止,还没有相关的报道认为突变等位基因和表型的严重程度有关^[30]。遗传性房间隔缺损,或伴房室传导阻滞的房间隔缺损患者,*NKx2.5* 基因检测将有助于预测室性心律失常或心源性猝死^[31]。如果他们是基因突变携带者,可预防性地在这些患者体内植入心脏复律除颤仪^[32]。

综上,组织特异性 *NKx2.5* 同源核蛋白是心肌细胞前体最早的标记,是心脏形成的关键,它在心脏发育过程中与其他转录因子协同作用,与心肌特异基因的调控表达在一起,共同促进前体心肌细胞的发育。早期进行 *NKx2.5* 基因检测将有助于早期诊断和治疗遗传性 CHD,预防心动过缓或过速导致的心源性猝死。

【参考文献】

- [1] Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte maturation: new phase in development[J]. Circ Res, 2020, 126(8): 1086-1106. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315862.
- [2] Xu YJ, Qiu XB, Yuan F, et al. Prevalence and spectrum of *NKX2.5* mutations in patients with congenital atrial septal defect and atrioventricular block[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 2247-2254. DOI: 10.3892/mmr.2017.6249.
- [3] Malakar AK, Halder B, Paul P, et al. Genetic evolution and codon usage analysis of *NKX-2.5* gene governing heart development in some mammals[J]. Genomics, 2020, 112(2): 1319-1329. DOI: 10.1016/j.ygeno.2019.07.023.
- [4] Zakariyah AF, Rajgara RF, Horner E, et al. *In vitro* modeling of congenital heart defects associated with an *NKX2-5* mutation revealed a dysregulation in BMP/notch-mediated signaling[J]. Stem Cells, 2018, 36(4): 514-526. DOI: 10.1002/stem.2766.
- [5] 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. DOI: 10.

- 1093/cvr/cvr037.
- [6] Kim KH, Rosen A, Hussein SM, *et al.* Irx3 is required for postnatal maturation of the mouse ventricular conduction system[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19197. DOI: 10.1038/srep19197.
- [7] Kasahara H, Ueyama T, Wakimoto H, *et al.* *Nkx2.5* homeoprotein regulates expression of gap junction protein connexin 43 and sarcomere organization in postnatal cardiomyocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(3): 243–256. DOI: 10.1016/s0022-2828(03)00002-6.
- [8] Anderson DJ, Kaplan DI, Bell KM, *et al.* *NKX2-5* regulates human cardiomyogenesis *via* a HEY2 dependent transcriptional network[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1373. DOI: 10.1038/s41467-018-03714-x.
- [9] Mishra V, Zaidi S, Axiaq A, *et al.* Sudden cardiac death in children with congenital heart disease: a critical review of the literature[J]. *Cardiol Young*, 2020, 30(11): 1559–1565. DOI: 10.1017/S1047951120003613.
- [10] Lauschke K, Treschow AF, Rasmussen MA, *et al.* Creating a human-induced pluripotent stem cell-based *NKX2.5* reporter gene assay for developmental toxicity testing[J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(5): 1659–1670. DOI: 10.1007/s00204-021-03018-y.
- [11] Thiele F, Voelkner C, Krebs V, *et al.* *Nkx2.5* based ventricular programming of murine ESC-derived cardiomyocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(2): 337–354. DOI: 10.33594/00000142.
- [12] Whitcomb J, Gharibeh L, Nemer M. From embryogenesis to adulthood: critical role for GATA factors in heart development and function[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(1): 53–67.
- [13] Uchino T, Zheng MQ, Wang Y, *et al.* Cardiac specific transcription factor *Csx/Nkx2.5* regulates transient-outward K(+) channel expression in pluripotent P19 cell-derived cardiomyocytes[J]. *J Physiol Sci*, 2020, 70(1): 20. DOI: 10.1186/s12576-020-00748-z.
- [14] Yin L, Liu MX, Wang FY, *et al.* Transcription factor *prx1* promotes brown adipose-derived stem cells differentiation to sinus node-like cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(11): 1313–1322. DOI: 10.1089/dna.2019.4998.
- [15] El-Bouchikhi, Belhassan K, Moufid FZ, *et al.* Novel *NKX2-5* germline mutation in a Moroccan child with transitional atrio-ventricular septal defect (tAVSD)[J]. *Turk J Pediatr*, 2017, 59(5): 610–613. DOI: 10.24953/turkped.2017.05.019.
- [16] Feng Y, Yang P, Luo S, *et al.* *Shox2* influences mesenchymal stem cell fate in a co-culture model *in vitro*[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 637–642. DOI: 10.3892/mmr.2016.5306.
- [17] Zheng J, Li F, Liu J, *et al.* Investigation of somatic *NKX2-5* mutations in Chinese children with congenital heart disease[J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(7): 538–543. DOI: 10.7150/ijms.11700.
- [18] Furtado MB, Wilmanns JC, Chandran A, *et al.* Point mutations in murine *NKX2-5* phenocopy human congenital heart disease and induce pathogenic Wnt signaling[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(6): e88271. DOI: 10.1172/jci.insight.88271.
- [19] 孙森, 孙桂凤, 孙开来. *Nkx2-5* 基因与心脏发育[J]. 中国医科大学学报, 2001, 30(5): 321–324.
Sun M, Qiu GR, Sun KL, *et al.* Mutation and expression of *NKX2.5* gene in human simple congenital heart disease [J]. *J Chin Med Univ*, 2001, 30(5): 321–324.
- [20] Khatami M, Mazidi M, Taher S, *et al.* Novel point mutations in the *NKX2.5* gene in pediatric patients with non-familial congenital heart disease[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2018, 54(3): 46. DOI: 10.3390/medicina54030046.
- [21] Chen J, Xu S, Li W, *et al.* *Nkx2.5* insufficiency leads to atrial electrical remodeling through Wnt signaling in HL-1 cells[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4631–4636. DOI: 10.3892/etm.2019.8134.
- [22] Khatami M, Heidari MM, Tabesh F, *et al.* Mutation analysis of the *NKX2.5* gene in Iranian pediatric patients with congenital hypothyroidism[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2017, 30(8): 857–862. DOI: 10.1515/jpem-2017-0084.
- [23] Rochais F, Mesbah K, Kelly RG. Signaling pathways controlling second heart field development[J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 933–942. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.194464.
- [24] Abou Hassan OK, Fahed AC, Batrawi M, *et al.* *NKX2-5* mutations in an inbred consanguineous population: genetic and phenotypic diversity[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8848. DOI: 10.1038/srep08848.
- [25] Kalayinia S, Ghasemi S, Mahdih N, *et al.* A comprehensive *in silico* analysis, distribution and frequency of human *Nkx2-5* mutations; a critical gene in congenital heart disease[J]. *J Cardiovasc Thorac Res*, 2019, 11(4): 287–299. DOI: 10.15171/jcvtr.2019.47.
- [26] Simmons MA, Brueckner M. The genetics of congenital heart disease understanding and improving long-term outcomes in congenital heart disease: a review for the general cardiologist and primary care physician[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2017, 29(5): 520–528. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000538.
- [27] Pulignani S, Vecoli C, Borghini A, *et al.* Targeted next-generation sequencing in patients with non-syndromic congenital heart disease[J]. *Pediatr Cardiol*, 2018, 39(4): 682–689. DOI: 10.1007/s00246-018-1806-y.
- [28] Hanley A, Walsh KA, Joyce C, *et al.* Mutation of a common amino acid in *NKX2.5* results in dilated cardiomyopathy in two large families[J]. *BMC Med Genet*, 2016, 17(1): 83. DOI: 10.1186/s12881-016-0347-6.
- [29] Ellesøe SG, Johansen MM, Bjerre JV, *et al.* Familial atrial septal defect and sudden cardiac death: identification of a novel *NKX2-5* mutation and a review of the literature[J]. *Congenit Heart Dis*, 2016, 11(3): 283–290. DOI: 10.1111/chd.12317.
- [30] Maury P, Gandjbakhch E, Baruteau AE, *et al.* Cardiac phenotype and long-term follow-up of patients with mutations in *NKX2-5* gene[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(21): 2389–2390. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.08.064.
- [31] 王颖, 边传振, 蒋艳丽, 等. 房间隔缺损新生儿脑体积的 MRI 研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(11): 1622–1624.
Wang Y, Bian CZ, Jiang YL, *et al.* MRI study of brain volume in neonates with atrial septal defect[J]. *J Nanjing Med Univ (Nat Sci)*, 2018, 38(11): 1622–1624.
- [32] Gao X, Zheng P, Yang L, *et al.* Association of functional variant in *GDF1* promoter with risk of congenital heart disease and its regulation by *Nkx2.5*[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(12): 1281–1295. DOI: 10.1042/CS20181024.