

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.03.003

文章编号: 1005-8982(2016)03-0014-04

论著

先天性马蹄内翻足与 *FoxO* 基因家族的相关性研究*

程国杰, 艾克巴尔·阿不都热西提, 王晶, 王磊
(新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 探索先天性马蹄内翻足(CTEV)与肌肉组织 *FoxO* 基因家族(*FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4*) 基因表达的相关性。**方法** 将 2012~2014 年新疆医科大学附属中医医院 80 例 CTEV 患儿及 40 例健康儿童纳入研究, 运用实时荧光定量聚合酶链反应(Real time-qPCR)和 Western blot 方法检测 CTEV 患儿和健康儿童足部肌肉组织 *FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4* 的基因转录及表达水平。**结果** ①与健康儿童比较, CTEV 患儿肌肉组织中 *FoxO1* 基因转录水平存在明显下调, 差异有统计学意义($P=0.021$); *FoxO3*、*FoxO4* 基因转录水平无明显变化, 差异无统计学意义($P=0.738$)。②CTEV 患儿肌肉组织中 *FoxO1* 蛋白表达量比健康儿童更少, 差异有统计学意义($P=0.017$); *FoxO3*、*FoxO4* 蛋白表达水平差异无统计学意义($P=0.672$)。③与汉族 CTEV 患儿比较, 维吾尔族 CTEV 患儿肌肉组织中 *FoxO1* 基因转录水平存在显著下调; *FoxO3*、*FoxO4* 基因转录水平差异无统计学意义。**结论** CTEV 与 *FoxO* 基因家族之间存在相关性, *FoxO1* 表达水平的降低可能与 CTEV 的发生有关, 并提示新疆地区维吾尔族 CTEV 患儿更易受 *FoxO1* 表达水平的影响。

关键词: 先天性马蹄内翻足; *FoxO* 基因家族; 表达水平

中图分类号: R726.8

文献标识码: A

Association between idiopathic congenital talipes equinovarus and *FoxO* gene family*

Guo-jie Cheng, A-budurexiti·Aikebare, Jing Wang, Lei Wang
(The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Xinjiang Medical University,
Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: Objective To study the association between idiopathic congenital talipes equinovarus (CTEV) and *FoxO* gene family (*FoxO1*, *FoxO3* and *FoxO4*). **Methods** A total of 80 CTEV patients and 40 normal controls were collected in the Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University between 2012 and 2014. The RT-PCR and Western blot were performed to evaluate the levels of mRNA and protein of *FoxO1*, *FoxO3* and *FoxO4* from CTEV patients and normal controls. **Results** Compared with the normal controls, the CTEV patients showed down-regulation of *FoxO1* gene in transcription ($P=0.021$). However there was no difference in *FoxO3* or *FoxO4* ($P=0.738$). Western blot showed that *FoxO1* protein was down-regulated in muscular tissue of the CTEV patients ($P=0.017$), neither *FoxO3* nor *FoxO4* protein level had significant difference ($P=0.672$). Compared with the Han CTEV patients, the Uygur CTEV patients showed down-regulation of *FoxO1* gene in transcription ($P<0.05$), but there was no difference in *FoxO3* or *FoxO4* ($P>0.05$). **Conclusions** There is a significant correlation between CTEV and *FoxO* gene family. The low expression level of *FoxO1* could lead to the occurrence of CTEV. In addition, these results indicated that the Uygur CTEV patients are prone to be influenced by the expression level of *FoxO1*.

Keywords: idiopathic congenital talipes equinovarus; *FoxO* gene family; expression level

收稿日期: 2015-10-30

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81160215)

[通信作者] 艾克巴尔·阿不都热西提, E-mail: king-2032169@163.com

先天性马蹄内翻足 (idiopathic congenital talipes equinovarus, ICTEV) 是一种常见的严重危害儿童健康的先天畸形,由足下垂、内翻、内收 3 个主要畸形综合而成,我国 ICTEV 发病率约为 0.6‰ ~ 1.0‰^[1]。目前 ICTEV 病因尚未明确,国外相关研究显示,血管发育异常可直接影响肌肉及骨骼的发育,ICTEV 发病可能与幼儿血管发育异常有关^[2-3]。

FoxO 转录因子属于 Fox 家族一员,哺乳动物 FoxO 家族主要包括 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4^[4]。3 种 FoxO 转录因子在维持动物血管稳定和保持造血干细胞健康发挥关键作用^[5]。国外研究发现,基因工程小鼠在缺失 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 基因后,会出现血管严重畸形现象。基于以上研究成果,本研究对 80 例汉族、维吾尔族 ICTEV 患儿及 40 例健康儿童的 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 基因进行转录、表达水平的检测,统计分析相关数据,拟阐明 ICTEV 与 FoxO 基因家族的相关性,以进一步明确 ICTEV 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病例组 收集 2012 ~ 2014 年新疆医科大学附属中医医院创伤骨科收治的 80 例 ICTEV 患者组织样本。其中,维吾尔族 58 例,汉族 22 例,且所有患者均符合北京协和医院编写的骨科诊疗常规中 ICTEV 诊断标准。

1.1.2 正常对照组 收集同时期 40 例维吾尔族和汉族健康儿童组织样本。其中,维吾尔族 15 例,汉族 25 例,且所有组织样本采集均征得研究对象的知情同意,并签署知情同意书。

1.2 实时荧光定量聚合酶链反应检测 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 在 ICTEV 患儿和健康儿童肌肉组织中的基因表达水平

1.2.1 总 RNA 提取及逆转录 运用 Trizol 法提取病例组、正常对照组肌肉组织的总 RNA,溶于焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC)。使用美国 Invitrogen 公司鼠白血病病毒 (moloney's leukemia virus, MLV) 逆转录试剂盒进行 RNA 逆转录,将逆转录产物 cDNA 置于 -70℃ 冰箱冷冻保存、备用。

1.2.2 实时聚合酶链反应 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) 按照美国 Invitrogen 公司 Platinum[®]SYBR[®]Green qPCR Super MIX kit 使用说明加入所需试剂及引物 (引物设计见表 2)。

反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环。由于使用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法 (β-actin 为内参基因),因此每个样品的扩增效率均需校正。

表 1 real-time PCR 引物设计

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃	扩增片段/bp
FoxO1	正向引物:AATTC AATTCGTCATAATCTGTC	58	204
	反向引物:CGAAATG TACTCCAGTTATCAAAG		
FoxO3	正向引物:AAAGGAAACCTAACAGCTC	58	203
	反向引物:TCCGCTTCAAGACCTCATTTG		
FoxO4	正向引物:TTC CATTCCCTGCTATCTC	58	203
	反向引物:GGTGGCGTATCAGAGGTGAG		
β-actin	正向引物:TTC CATTCCCTGCTATCTC	58	205
	反向引物:GGTGGCGTATCAGAGGTGAG		

1.3 Western blot 检测 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 在肌肉组织中的表达水平

提取病例组、正常对照组肌肉组织蛋白,并以 Bradford 法测定总蛋白量。分别取 30 μg 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 电泳后转入聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜进行封闭。封闭后,首先用经 1:500 稀释的鼠抗人 FoxO1 抗体、鼠抗人 FoxO3 抗体、鼠抗人 FoxO4 抗体和鼠抗人 β-actin 抗体 (内参) 室温杂交 1 h,然后以经 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗室温孵育 1 h。条带经 Odyssey 红外线荧光扫描后采用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计数资料进行 χ^2 检验,计量资料进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较

各组性别、年龄比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而单侧马蹄内翻足、双侧马蹄内翻足的汉族 ICTEV 患儿与维吾尔族 ICTEV 患儿比较,差异有统计学意义 ($P = 0.031$),见表 2。

2.2 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 基因在 ICTEV 患儿和健康儿童肌肉组织中的转录情况

ICTEV 患儿足部肌肉组织的 FoxO1 转录水平

表 2 研究对象的一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	民族	例数		年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	单侧马蹄 内翻足/ 例	双侧马蹄内 翻足/ 例
		男	女			
病例组	汉族	12	10	4.3 ± 5.1	15	7
	维吾尔族	27	31	4.4 ± 5.9	30	28
正常对照组	汉族	12	13	4.5 ± 6.1	0	0
	维吾尔族	8	7	4.4 ± 6.2	0	0

低于健康儿童($P=0.021$),而两组 *FoxO3* 和 *FoxO4* 转录水平比较,差异无统计学意义($P=0.738$)(见图 1)。新疆维吾尔族 ICTEV 患儿足部肌肉组织的 *FoxO1* 转录水平低于新疆汉族 ICTEV 患儿($P=0.032$),而两组 *FoxO3* 和 *FoxO4* 转录水平比较,差异无统计学意义($P=0.692$)(见图 2)。

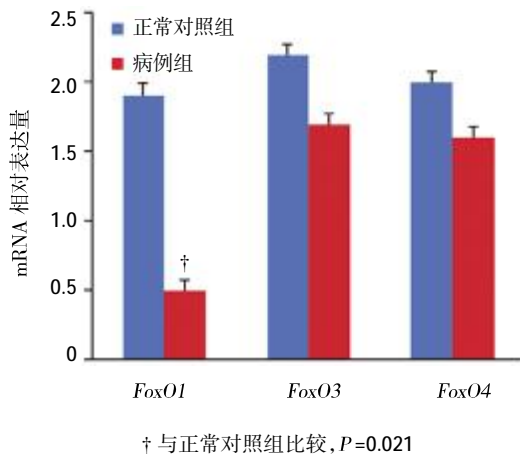
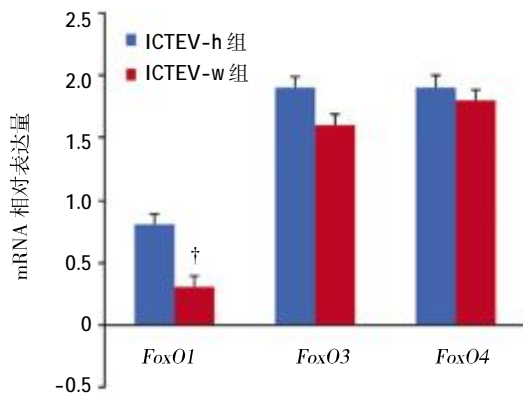


图 1 ICTEV 患儿和健康儿童足部肌肉组织中 *FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4* 转录情况



ICTEV-h 组:汉族病例患儿;ICTEV-w 组:维吾尔族病例患儿
† 与 ICTEV-h 组比较, $P=0.032$

图 2 新疆维吾尔族和汉族 ICTEV 患儿足部肌肉组织中 *FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4* 转录情况

2.3 ICTEV 患儿和健康儿童肌肉组织中 *FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4* 蛋白表达情况

与健康儿童足部肌肉组织 *FoxO1* 蛋白比较, ICTEV 患儿足部肌肉组织中 *FoxO1* 蛋白表达量更少,差异有统计学意义($P=0.017$),两组 *FoxO3* 和 *FoxO4* 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P=0.672$)。见图 3、4。

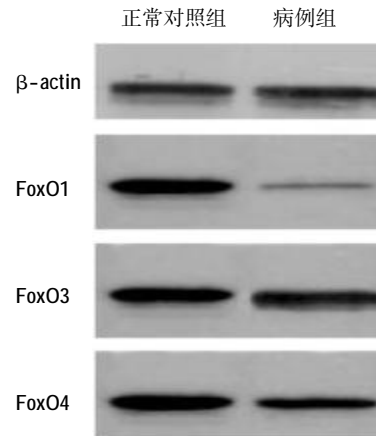


图 3 *FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4* 在 ICTEV 患儿和健康儿童足部肌肉组织中的表达

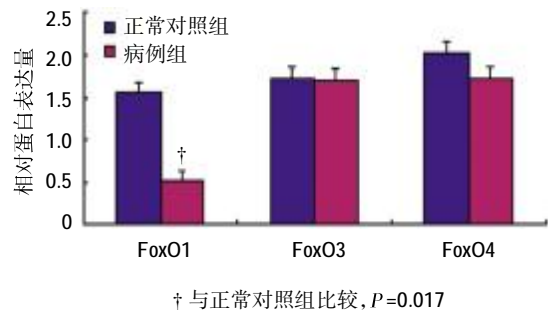


图 4 ICTEV 患儿和健康儿童足部肌肉组织中 *FoxO1*、*FoxO3* 和 *FoxO4* 蛋白表达情况

3 讨论

先天性小儿马蹄内翻足是一种较为常见的先天畸形,患儿一出生即在神经、肌肉、骨骼及软骨等方面表现出病理变化,且难以矫正。虽然小儿马蹄内翻足的相关研究已近 1 个世纪,但具体病因仍未明确^[6-7],仅提示遗传、环境、毒性物质、易感基因等因素可能影响胚胎发育而导致马蹄内翻足^[8-10]。因此,加强 ICTEV 致病机制的研究,是有效防范小儿先天畸形的重要手段。

FoxO 基因家族是一类 DNA 结合区具有翼状螺旋结构的转录因子,不仅能通过招募共激活因子等

调节基因转录,还能直接同凝聚染色质结合而参与其重构,协同其他转录因子参与转录调节,其在胚胎发育、免疫调节、维持造血干细胞生长等生物学过程中发挥重要作用^[11-13]。国外相关研究发现,缺失 FoxO 基因家族 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 基因的实验小鼠会出现严重的血管畸形现象。本研究结合 ICTEV 中血管畸形病变,可提示 FoxO 基因家族可能在 ICTEV 致病过程中发挥作用。

本实验对 80 例汉族、维吾尔族 ICTEV 患儿及 40 例健康儿童足部肌肉组织 FoxO1、FoxO3 和 FoxO4 基因的转录及表达水平进行研究,发现 ICTEV 患儿的 FoxO1 基因较健康儿童下降,其中维吾尔族 ICTEV 患儿 FoxO1 基因转录表达水平低于汉族 ICTEV 患儿;ICTEV 患儿 FoxO3、FoxO4 基因转录表达水平与健康儿童比较,差异无统计学意义。FoxO1 作为众多传导通路中的重要交叉点,除参与细胞凋亡、DNA 损伤与修复、骨代谢、肿瘤发生等生命活动外,也与血管形成密切相关^[14-15],2014 年 10 月,德国 Max Planck Institute 研究所发现,FoxO1 可以调节血管壁中细胞的分裂。先天性小儿马蹄内翻足的发病,同样伴随着血管畸形的病理变化,该变化与本研究结果结合,可进一步明确 FoxO1 与 ICTEV 的发病具有相关性,并初步推论为 FoxO1 通过基因转录和蛋白表达水平的调控,影响血管的稳定,从而进一步引起 ICTEV 的发病。此外,本研究也发现 FoxO3、FoxO4 在 ICTEV 患儿与健康儿童中的差异无统计学意义,该结果或许能推测 ICTEV 的血管畸形主要通过 FoxO1 低表达予以实现。不同种族的先天性小儿马蹄内翻足的发病率比较,差异有统计学意义,从 0.65%~7.00%,在新疆,ICTEV 以维吾尔族儿童发病率为最高,本研究中,新疆维吾尔族 ICTEV 患儿 FoxO1 基因转录及表达水平比健康儿童和汉族 ICTEV 患儿都低,差异有统计学意义,该结果提示新疆维吾尔族 ICTEV 儿童更容易受 FoxO1 水平变化的影响。

综上所述,ICTEV 的致病原因是复杂且多样的,FoxO1 基因转录及表达水平的变化作为引起 ICTEV

发病的一种可能,将会成为未来研究 ICTEV 致病的重要方向。其中 FoxO1 受何种信号通路的调控以及是否自身基因突变等原因,而引发表达水平发生变化,都有待研究验证。

参 考 文 献:

- [1] 易玲,周光莹,代礼,等. 2001~2010 年中国先天性马蹄内翻足的流行病学分析[J]. 四川大学学报(医学版), 2013, 44(4): 606-609.
- [2] Werler MM, Yazdy MM, Mitchell AA, et al. Descriptive epidemiology of idiopathic clubfoot[J]. Am J Med Genet A, 2013, 161(7): 1569-1578.
- [3] Parker SE, Mai CT, Strickland MJ, et al. Multistate study of the epidemiology of clubfoot[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009, 85(11): 897-904.
- [4] 黄宁,李文佳,安利国,等. FoxO1 的功能及其与人类疾病的关系[J]. 生命科学, 2012, 24(4): 334-338.
- [5] 关尚一. FoxO 转录因子在运动骨骼肌领域的研究进展[J]. 运动人体科学, 2013, 3(24): 22-24.
- [6] 司晓凤,叶娇,王玉辉,等. 先天性马蹄内翻足病因的研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 2014, 16(3): 181-184.
- [7] 刘卫勇,际亚青,赵黎,等. 小儿先天性马蹄内翻足小腿肌肉超声改变[J]. 中华医学超声杂志: 电子版, 2010, 7(6): 982-990.
- [8] 杜香平,吴欣乐,余丽蓉,等. Pitx1 基因突变与先天性马蹄内翻足的相关性研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2013, 34(6): 443-446.
- [9] 赵宁,金春莲,刘丽英,等. COL1A1 基因转录调控序列变异与单纯性马蹄内翻足的相关性[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(4): 433-435.
- [10] 曹东华,王谦,林长坤,等. Gli3、EN1 基因在单纯性马蹄内翻足发生中的功能研究[J]. 遗传, 2009, 12(31): 1214-1220.
- [11] 朱宇腾,张勇,李艳,等. FoxO 转录因子的活性调控及其对骨骼肌生长发育的调节[J]. 动物营养学报, 2013, 25(4): 677-684.
- [12] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor FoxO1 regulates adipocyte differentiation[J]. Dev Cell, 2003, 4(1): 119-129.
- [13] Greer EL, Brunet A. FoxO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression[J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7410-7425.
- [14] Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, et al. AKT/FoxO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias[J]. Cell, 2011, 146(5): 697-708.
- [15] Williams TM, Williams ME. Candidate downstream regulated genes of HOX group 13 transcription factors with and without monomeric DNA binding capability[J]. Dev Biol, 2005, 279(2): 462-480.

(申海菊 编辑)