

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.002

# PTGFR 基因在 DDH 患儿关节囊和圆韧带中的表达变化及其与 DDH 发病的相关性研究\*

赵利华, 焦 勤, 陈梦婕, 王一臣, 范玲燕, 马 峰, 应 灏, 王 隼<sup>△</sup>

(上海市儿童医院/上海交通大学附属儿童医院骨科 200062)

**[摘要]** 目的 分析前列腺素 F2 $\alpha$  受体 (PTGFR) 基因在发育性髋关节发育不良 (DDH) 患儿髋关节组织中的表达变化及其与 DDH 发病的相关性。方法 8 对年龄相近、性别相同的 DDH 患儿 (DDH 组) 和对照儿童 (对照组) 入组进行比较。采用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测两组患儿 PTGFR mRNA 和蛋白表达水平。结果 DDH 组患儿髋关节关节囊和圆韧带中 PTGFR mRNA 表达水平较对照组明显降低 ( $t=3.472, 2.887, P<0.05$ )。DDH 组患儿髋关节关节囊和圆韧带中 PTGFR 蛋白表达水平较对照组明显降低 ( $t=5.488, 3.942, P<0.05$ )。结论 PTGFR 可能在 DDH 发病中发挥重要作用, PTGFR 可能是 DDH 的致病基因之一。

**[关键词]** 关节囊; 圆韧带; 发育性髋关节发育不良; 前列腺素 F2 $\alpha$  受体基因

**[中图分类号]** R684.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)33-4613-03

## Expression change of PTGFR gene in articular capsule and ligamentum teres in DDH and its correlation with pathogenesis of DDH\*

Zhao Lihua, Jiao Qing, Chen Mengjie, Wang Yichen, Fan Lingyan, Ma Feng, Ying Hao, Wang Sun<sup>△</sup>

(Department of Orthopedics, Shanghai Municipal Children's Hospital/ Affiliated Children's Hospital,

Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200062, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the expression change of PTGFR gene in hip joint tissues of developmental dysplasia of the hip (DDH) and its correlation with DDH pathogenesis. **Methods** Eight age- and gender-matched children with DDH (DDH group) and control children (control group) were enrolled for conducting the comparison. The real-time quantitative PCR method and Western-blot method were adopted to detect the PTGFR mRNA and protein expression levels. **Results** PTGFR mRNA expression level in the hip articular capsule and ligamentum teres of the DDH group were significantly decreased compared with those of the control group ( $t=3.472, 2.887, P<0.05$ ). The PTGFR protein expression level in the hip articular capsule and ligamentum teres of the DDH group were significantly decreased compared with those of the control group ( $t=5.488, 3.942, P<0.05$ ). **Conclusion** PTGFR could play an important role in DDH pathogenesis and may be one of DDH pathogenic genes.

**[Key words]** joint capsule; round ligament; developmental dysplasia of the hip; prostaglandin F2 $\alpha$  receptor gene

发育性髋关节发育不良 (developmental dysplasia of the hip, DDH) 是儿童骨科最常见的疾病之一。在我国 DDH 发病率达 5%, 国外为 2%~50%, 以女性占绝对优势, 其发病率在人间和地区间差异明显, 这与遗传因素、环境影响和生活习惯密切相关<sup>[1]</sup>。DDH 是由股骨近端和髋臼及其周围组织发育异常导致, 关节囊和韧带松弛是导致髋关节不稳定的主要因素之一<sup>[2]</sup>。目前, DDH 的明确致病基因和发病机制仍不清楚<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期研究结果提示前列腺素 F2 $\alpha$  受体 (prostaglandin F2 $\alpha$  receptor, PTGFR) 基因的突变与 DDH 的发病相关, 文献亦显示 PTGFR 基因与骨关节发育相关。为了进一步研究 PTGFR 与 DDH 的相关性, 本研究应用分子生物学方法比较 PTGFR 在 DDH 和非 DDH 患儿关节囊和圆韧带中转录水平和蛋白水平的表达差异, 为进一步从分子水平探索 PTGFR 在 DDH 发病中发挥作用的机制奠定基础。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 8 月至 2016 年 12 月入住本院的 DDH 患儿 8 例 (DDH 组), 均无家族史, 无合并其他畸形,

手术复位中采集切除的患髋关节囊和圆韧带。收集与 DDH 组性别相同年龄相近 (<6 个月) 的对照组儿童 8 例髋关节囊和圆韧带 (3 例来源于髋关节化脓性关节炎, 2 例来源于股骨头无菌性坏死, 1 例来源于股骨骨肉瘤手术切除, 2 例来源于意外死亡后尸检), 取材部位及方法同 DDH 组。DDH 组 8 例, 男 2 例, 女 6 例, 年龄 2~8 岁, 平均 (3.2 $\pm$ 0.8) 岁。对照组 8 例, 男 3 例, 女 5 例, 年龄 2~7 岁, 平均 (3.5 $\pm$ 1.4) 岁。两组一般资料比较差异无统计学意义 ( $t=1.036, P>0.05$ )。在标本离体后迅速剪取全厚层关节囊和中间 1/3 圆韧带, 将标本切成多块直径约为 0.5 cm 的组织块并装进带有编号的灭菌冻存管, 立即放进液氮转移罐, 最终于 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存备用。以上标本获取均获得参与人或其法定监护人的书面知情同意, 收集和使用病患生物样本均通过医院伦理委员会审核。

### 1.2 方法

**1.2.1 实时定量 PCR 检测髋关节囊及圆韧带中 PTGFR mRNA 的表达水平** 总 RNA 的分离和提取方法严格按照 Trizol 试剂盒说明书进行。紫外分光光度计 TU-1901 进行吸

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81401763); 上海卫生计生委科研项目 (20144Y0176); 上海市科学技术委员会科研项目 (12DZ2295006); 上海交通大学医学院“985”计划基金 (YBKL2013008)。 作者简介: 赵利华 (1982-), 主治医师, 博士, 主要从事先天性/发育性骨关节疾病发病机制研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: Wangs@shchildren.com.cn。

光度  $A_{260/280}$  和  $A_{260/230}$  比值的测定以确定样品总 RNA 的纯度和浓度。分别取总 RNA 各 500 ng 进行反转录,  $\beta$ -actin 作为内参。  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-TGA GAG GGA AAT CGT GCG TGA C-3', 下游引物: 5'-GCT CGT TGC CAA TAG TGA TGA CC-3'; PTGFR 上游引物: 5'-GTT TTC CGT CTG GCA GGT TGT-3', 下游引物: 5'-AGA TGA CTT GAG TGG TTG GCT TTT-3'。实时定量 PCR 反应混合液:  $2 \times$  SYBR Green qPCR Master Mix 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的上游引物 0.4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的下游引物 0.4  $\mu$ L, 加水至总体积为 20  $\mu$ L。实时定量 PCR 循环条件: 初始阶段 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 7 s(解链), 57  $^{\circ}$ C 10 s(退火), 72  $^{\circ}$ C 15 s(延伸), 共 40 个循环。完成加样后, 把加好样品的 96 孔板放在 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪中进行反应。实验重复 3 次, 数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行分析。

**1.2.2 蛋白质印迹法(Western blot)检测髋关节节囊及圆韧带中 PTGFR 蛋白的表达水平** 取两组患儿关节囊和圆韧带组织样本适量, 加 300  $\mu$ L 含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂后冰上研磨。研磨后冰上放置 10 min, 4  $^{\circ}$ C 15 300 r/min 离心 10 min。取上清液(即是总蛋白提取物)放入预冷的 1.5 mL 离心管。按 Bradford 蛋白质定量试剂盒操作说明操作, 测定样品浓度后行 SDS-PAGE 电泳, 半干法蛋白质转至 PVDF 膜, 按 Bio-Rad 蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层, 300 mA 恒流条件下按蛋白大小转膜。膜在 5% 脱脂奶粉溶液中室温孵 1 h 以封闭膜上的非特异结合, 封闭过的膜加一抗(PTGFR)室温孵育 1.5 h, TBST 洗脱 5 min  $\times$  3 次, HRP 标记的荧光二抗(1:5 000)常温下孵育 1 h, TBST 洗脱 5 min  $\times$  3 次, ECL 化学发光显像, Image J 软件测定灰度值。  $\beta$ -actin 作为内参照, 每个样本重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 髋关节节囊及圆韧带中 PTGFR mRNA 的表达水平** DDH 组患儿髋关节节囊、圆韧带中 PTGFR mRNA 的表达水平较对照组降低, 差异有统计学意义 ( $t = 3.472, 2.887, P < 0.05$ )。见图 1、表 1。

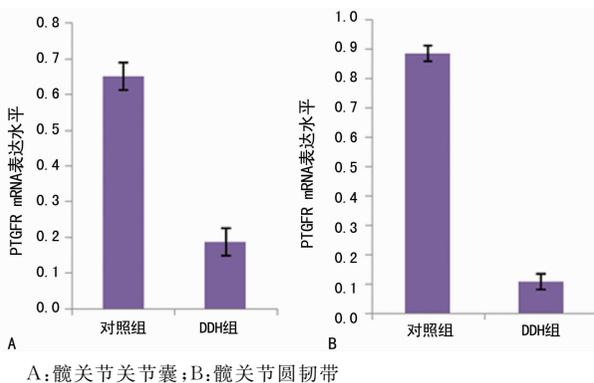


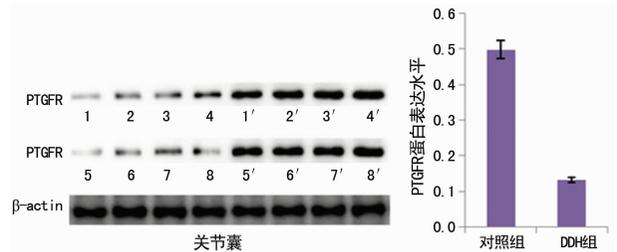
图 1 两组患儿髋关节节囊和圆韧带中 PTGFR mRNA 表达水平

**2.2 髋关节节囊及圆韧带中 PTGFR 蛋白的表达水平** DDH 组患儿髋关节节囊、圆韧带中 PTGFR 蛋白表达水平较对照组降低, 差异有统计学意义 ( $t = 5.488, 3.942, P < 0.05$ )。见图 2、3、表 2。

表 1 两组患儿髋关节节囊和圆韧带中 PTGFR mRNA 的表达情况

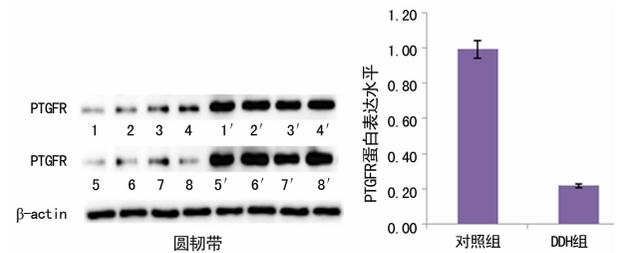
| 组别    | n | 关节囊                | 圆韧带                |
|-------|---|--------------------|--------------------|
| DDH 组 | 8 | 0.186 $\pm$ 0.024* | 0.108 $\pm$ 0.078* |
| 对照组   | 8 | 0.649 $\pm$ 0.076  | 0.886 $\pm$ 0.094  |

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组相比



1~8: DDH 组标本; 1'~8': 对照组标本

图 2 两组患儿髋关节节囊中 PTGFR 蛋白表达水平



1~8: DDH 组标本; 1'~8': 对照组标本

图 3 两组患儿髋关节圆韧带中 PTGFR 蛋白表达水平

表 2 两组患儿髋关节节囊和圆韧带中 PTGFR 蛋白表达情况

| 组别    | n | 关节囊                | 圆韧带                |
|-------|---|--------------------|--------------------|
| DDH 组 | 8 | 0.132 $\pm$ 0.074* | 0.215 $\pm$ 0.079* |
| 对照组   | 8 | 0.500 $\pm$ 0.057  | 0.992 $\pm$ 0.132  |

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组相比

## 3 讨 论

DDH 病因学复杂, 越来越多的研究显示环境因素和遗传因素共同参与 DDH 的发病。环境因素包括羊水过少、臀位、襁褓方法不当等<sup>[5]</sup>。流行病学研究显示, 遗传因素在 DDH 的发生中发挥重要作用, 67.88% 的 DDH 发病与遗传因素有关<sup>[6]</sup>, 同卵双生 DDH 的发病一致率(41.4%) 远远高于异卵双生的发病一致率(2.8%)<sup>[7]</sup>。包括家族聚集性研究、家系的复合分离分析、遗传模式分析和流行病学调查在内的多种研究结果也表明孤立型 DDH 符合常染色体显性遗传的一些特征, 但不表现为简单的孟德尔方式遗传, 可能由于其复杂的病因, DDH 往往表现为不完全外显性<sup>[3-4]</sup>, 这些证据都提示基因的异常在 DDH 的发病中发挥重要作用。

临床医师常常发现 DDH 患儿髋关节节囊和圆韧带存在松弛和薄弱<sup>[2,8]</sup>。人类出生时髋关节髋臼浅、股骨头表面形成的弧线平滑, 出生后髋臼不断加深、股骨头弧度加大, 髋关节逐渐稳定, 厚而坚韧的髋关节节囊和圆韧带在该稳定过程发挥重要作用<sup>[8]</sup>。髋关节的正常生长发育需要髋臼、股骨近端、关节周围韧带、血管、神经及肌肉的协调生长共同完成, 该过程

由复杂的基因网络调控,同时受环境、生物因素的影响<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究结果提示 PTGFR 基因的突变与 DDH 的发病相关。本研究进一步通过实时定量 PCR 技术和 Western blot 技术分别从 mRNA 和蛋白水平检测了 PTGFR 在 DDH 患儿髋关节囊和圆韧带中的表达,研究结果提示 DDH 患儿髋关节的关节囊和圆韧带中 PTGFR 的 mRNA 和蛋白表达明显低于对照组,进一步提示 PTGFR 很可能参与 DDH 的发病。

髋关节属于滑膜关节,它的两个关节面都由关节软骨被覆。软骨内成骨贯穿于正常骨和关节生长、发育及外伤后骨骼修复,软骨内成骨的软骨细胞分化过程受到多种生长因子和信号分子调控,其中一类信号分子即是前列腺素(prostaglandins, PGs),它是一组化学结构相似、具有广泛生物活性的不饱和脂肪酸,体内的 PGs 水平极微,但活性极强,除 PGE2 外,PGF2 $\alpha$  是关节液的主要 PGs,骨关节炎和类风湿性关节炎患者血液和关节液中的 PGE2 和 PGF2 $\alpha$  水平均明显增高<sup>[10]</sup>。PGF2 $\alpha$  能刺激鼠软骨细胞株聚糖蛋白合成并促进人关节软骨细胞中二型胶原蛋白 mRNA 的表达<sup>[11-12]</sup>。PGF2 $\alpha$  通过其受体 PTGFR 发挥生物学作用,PGF2 $\alpha$  与 PTGFR 结合,活化的 PTGFR 增加肌醇三磷酸/甘油二酯(IP3/DAG)水平,从而激活蛋白激酶 C(PKC),触发 Ca<sup>2+</sup> 从细胞内质网释放,从而发挥调控作用<sup>[13]</sup>。Wang 等<sup>[14]</sup>发现 PTGFR mRNA 表达于生长版的肥大软骨细胞,这提示 PTGFR-PGF2 $\alpha$  信号通路可能参与软骨细胞的肥大过程。Kim 等<sup>[15]</sup>发现 PTGFR 的表达在软骨形成后期明显增高,低表达 PTGFR 干扰软骨形成而人为的高表达 PTGFR 能促进软骨形成,该结果提示 PTGFR 的低表达会抑制软骨的形成,与本研究结果一致,提示 PTGFR 可能影响髋关节囊和圆韧带的发育从而参与 DDH 的发病。因此,PTGFR 极有可能在 DDH 的发病中发挥重要作用,但是目前为止,尚无文献报道 PTGFR 与 DDH 的发病相关,其中的机制需要大量研究进一步证实。

DDH 的临床表现、诊断标准和治疗方案均较明确,遗传因素在 DDH 发病中发挥着重要作用这一观念也被大多数临床工作者和科研工作者所认同,目前发现至少 5 个基因的突变和 DDH 的发病相关,但是,这些基因在 DDH 发病中发挥作用的分子机制均不明确,DDH 的发病机制更不清楚。本研究结果提示 PTGFR 参与 DDH 的发病,但是其分子机制还需要大量细胞学和动物学研究不断探索和研究。

## 参考文献

[1] Kolb A, Schweiger N, Mailath-pokorny YM, et al. Low incidence of early developmental dysplasia of the hip in Universal ultrasonographic screening of newborns: analysis and evaluation of risk factors[J]. *Int Orthop*, 2016, 40(1):123-127.

[2] Philippon MJ, Trindade CA, Goldsmith MT, et al. Biomechanical assessment of hip capsular repair and Reconstruction procedures using a 6 degrees of freedom robotic system[J]. *Am J Sports Med*, 2017, 45(8):1745-1754.

[3] Zhao LH, Zhou ZW, Wang S, et al. A recurrent mutation in bone morphogenetic proteins-2-inducible kinase gene is

associated with developmental dysplasia of the hip[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5):1773-1778.

[4] Feldman GJ, Parvizi J, Sawan H, et al. Linkage mapping and whole exome sequencing identify a shared variant in CX3CR1 in a large multi-generation family[J]. *J Arthroplasty*, 2014, 29(9 Suppl):S238-241.

[5] Mulpuri K, Schaeffer EK, Andrade J, et al. What risk factors and characteristics are associated with late-presenting dislocations of the hip in infants? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2016, 474(5):1131-1137.

[6] Ceylaner G, Ceylaner S, Ustunkan F, et al. Autosomal dominant inheritance of congenital dislocation of the hip in 16 members of a family[J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2008, 42(4):289-291.

[7] Li LY, Sun KM, Zhang LJ, et al. Heritability and sibling recurrent risk of developmental dysplasia of the hip in Chinese population[J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(6):589-594.

[8] 邱旭升, 蒋青. 髋关节正常生长发育的研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(16):2401-2404.

[9] Stafford DA, Monica SD, Harland RM. Follistatin interacts with Noggin in the development of the axial skeleton [J]. *Mech Dev*, 2014, 131(1):78-85.

[10] Basu S, Whiteam M, Matthey DL, et al. Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(6):627-631.

[11] Lowe GN, Fu YH, Mcdougall S, et al. Effects of prostaglandins on deoxyribonucleic acid and aggrecan synthesis in the RCJ 3.1C5.18 chondrocyte cell line; role of second messengers[J]. *Endocrinology*, 1996, 137(6):2208-2216.

[12] Caron MM, Emans PJ, Sanen KA, et al. The role of prostaglandins and COX-Enzymes in chondrogenic differentiation of ATDC5 progenitor cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0153162.

[13] Milne SA. (2alpha)receptor expression and signaling in human endometrium; role of PGF(2alpha)in epithelial cell proliferation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(4):1825-1832.

[14] Wang Y, Middleton F, Horton JA, et al. Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways[J]. *Bone*, 2004, 35(6):1273-1293.

[15] Kim J, Shim M. Prostaglandin F2 $\alpha$  receptor (FP) signaling regulates Bmp signaling and promotes chondrocyte differentiation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(2):500-512.