

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00723

COL1A1 基因转录调控序列变异与单纯性马蹄内翻足的相关性

赵宁, 金春莲, 刘丽英, 曹东华, 林长坤, 吉士俊, 孙开来

中国医科大学医学遗传学教研室, 沈阳 110001

摘要: 采用半定量 RT-PCR 方法检测 20 例单纯性马蹄内翻足患儿下肢肌肉及肌腱组织中 COL1A1 基因 mRNA 的表达, 根据 COL1A1 基因转录调控区-1 031 bp~+30 bp 及第 1 内含子的序列, 设计 8 对引物, PCR 扩增后, 采用变性梯度凝胶电泳技术筛查突变并测序。半定量 RT-PCR 结果表明, 与正常对照组相比, 单纯性马蹄内翻足患儿患侧肌肉及肌腱组织中 COL1A1 基因表达水平明显上调($t=12.680, P<0.05$); 经 PCR-DGGE 筛查并测序发现 1 名患者存在-161(C→T)的杂合变异, 另 1 名患者存在+274(C→G)的纯合变异。二者均为新发现的变异。提示 COL1A1 基因转录调控序列变异可能是单纯性马蹄内翻足的致病原因之一。

关键词: 单纯性马蹄内翻足; COL1A1 基因; 反转录聚合酶链反应; 基因变异; 变性梯度凝胶电泳

Association study between mutations of transcription regulator sequences of COL1A1 gene and idiopathic congenital talipes equinovarus

ZHAO Ning, JIN Chun-Lian, LIU Li-Ying, CAO Dong-Hua, LIN Chang-Kun, JI Shi-Jun, SUN Kai-Lai

Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: RT-PCR was used to detect the expressions of COL1A1 mRNA in 20 patients with idiopathic congenital talipes equinovarus (ICTEV). The primers were designed by Primer 5 according to sequences of -1 031 bp~+30 bp and the first intron of COL1A1. PCR-DGGE was used to screen the mutations in COL1A1 gene. Expression of COL1A1 on mRNA levels showed significantly higher in patients with ICTEV than in normal persons ($t=12.680, P<0.05$). By DNA sequencing, a -161(T→C) heterozygous mutation and a +274(C→G) homozygous mutation were detected, and both were new identified mutations. These results indicated that the mutations in transcription regulator sequences of COL1A1 could cause ICTEV.

Keywords: idiopathic congenital talipes equinovarus; COL1A1 gene; reverse transcription-polymerase chain reaction; gene mutation; denaturing gradient gel electrophoresis

单纯性马蹄内翻足(idiopathic congenital talipes equinovarus, ICTEV)是一种常见的严重危害儿童健

康的先天性足部畸形。其发病率与种族及性别有明显关系, 在我国约为 0.6‰~1‰, 男女之比约为 2.6:1,

收稿日期: 2007-10-29; 修回日期: 2008-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30471803)和国家重点基础研究发展规划项目(编号: 2001CB510301)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471803) and the National Basic Research Program (No. 2001CB510301)]

作者简介: 赵宁(1978-), 女, 辽宁人, 硕士研究生, 研究方向: 遗传病的分子遗传学。Tel: 13130220918; E-mail: ningzhao78@hotmail.com

通讯作者: 金春莲(1945-), 女, 朝鲜族, 辽宁人, 教授, 研究方向: 遗传病的分子遗传学。Tel: 024-23256666-5324; E-mail: chunlianjin@126.com

双侧发病者占 50.9%^[1]。近年来国内外对于 ICTEV 的病因争论较多,包括:骨骼发育异常、神经肌肉病变、软组织挛缩、血管异常、宫内发育阻滞、母亲吸烟、受孕月份及出生季节等^[2],但均缺乏有力的证据。多数学者认为,ICTEV 主要是肢芽发育的易损期由于遗传因素和环境因素的共同作用,某些与肢体发育有关的基因及其产物出现异常的结果。目前有研究者运用相关分析、半定量 RT-PCR 等方法初步确定 *HOXD*^[3]、*Gli3*^[4]、*COL9A1*^[5] 及 *NAT2*^[6] 基因可能与 ICTEV 的发生有关,但还需要进行进一步的深入研究。国内外研究表明,在 ICTEV 患侧组织中存在纤维组织明显增加,其中 Ⅰ型胶原增加最显著。Ⅰ型胶原是皮肤、骨、肌腱、韧带、血管、牙质和许多间质组织的主要组成成分,其主要功能是作为组织支持物,赋予组织以张力,同时还与细胞的生长、分化、增生、组织损伤的修复以及炎症反应、硬化、纤维化等均密切相关。Ⅰ型胶原是由两条 $\alpha 1$ 链及一条 $\alpha 2$ 链组成的三螺旋结构,其 $\alpha 1$ 链和 $\alpha 2$ 链分别由 *COL1A1* 和 *COL1A2* 基因编码。Ⅰ型胶原基因突变可导致多种疾病的发生,而 *COL1A2* 基因突变产生的后果要比 *COL1A1* 基因发生类似突变产生的后果温和得多。*COL1A1* 基因大小约 18 kb,含有 51 个外显子,位于 17q21.3~q22^[7]。目前已发现上百种 *COL1A1* 基因突变,主要集中在外显子。*COL1A1* 基因突变可导致多种疾病的发生,主要可引起先天性成骨不全 (Osteogenesis Imperfecta, OI)、Ehlers Dahlos 综合征 (EDS)、骨质疏松症 (Osteoporosis)。但是对于 *COL1A1* 基因与 ICTEV 相关性的进一步研究至今仍未见报道。

1 对象和方法

1.1 对象

肌肉及肌腱标本来自于 20 例手术矫正的 ICTEV 患儿患肢,取 4 例外伤及尸检患儿下肢相应组织作为正常对照。84 例 ICTEV 患者的静脉抗凝血,其中男性 60 例,女性 24 例(男女比例为 2.5 :1)。所有患者均具有典型的临床症状,经 X 线和手术确诊。100 例正常人,均来自中国东北地区正常汉族人群。所有标本均经患者知情同意。标本由中国医科大学附属第二医院小儿外科提供。

1.2 方法

1.2.1 半定量 RT-PCR 分析 *COL1A1* 基因在 ICTEV 患儿患肢及正常对照肌肉、肌腱组织中的表达

1.2.1.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取约 100 mg 组织,于液氮中冷冻 10 min,取出迅速击碎后,应用 TRIzol 试剂按实验室常规方法提取总 RNA。紫外分光光度计检测其纯度与浓度,用反转录试剂盒 (TaKaRa 公司产品) 将总 RNA 反转录成 cDNA,总体积为 20 μ L。

1.2.1.2 半定量 RT-PCR

利用 Primer5 软件设计一对 *COL1A1* cDNA 特异性引物,上游引物为: 5'-AACAGACAAGCAACCC-AAAC-3'; 下游引物为: 5'-TAACCCAACGGGCAGAAA-3', 扩增片段为 279 bp。 β -actin cDNA 特异性引物作为内对照,扩增片段为 381 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

PCR 反应体系: cDNA 约 40 ng, 10 \times 反应缓冲液 (MgCl₂ 15 mmol/L) 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 两对上下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L, Taq 酶 2 U, 无菌水定容至 25 μ L。循环参数: 94 预变性 5 min, 94 变性 45 s, 57 复性 45 s, 72 延伸 45 s, 循环 35 次; 最后 72 延伸 10 min。PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭 (Ethidium Bromide, EB) 染色,凝胶成相仪下观察,拍照。使用 Fluor Chem V2.0 Stand Alone program 软件分析马蹄内翻足组织与正常对照 *COL1A1* mRNA 与 β -actin mRNA 相对表达比。

1.2.1.3 统计学分析

用 SPSS 10.0 软件对 *COL1A1* 基因表达情况进行统计学分析, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

1.2.2 PCR-DGGE

1.2.2.1 基因组 DNA 提取

应用常规饱和氯化钠法提取基因组 DNA。

1.2.2.2 PCR 扩增

应用 Primer5 软件,以 *COL1A1* 基因 -1 031 bp~+30 bp 为模板设计 4 对引物,以其第 1 内含子为模板设计 4 对引物,并在各上游引物 5 端加 40 bp [GC] 夹板*。所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列、扩增片段长度及相应复性温度见表 1。

* [GC] 夹板: CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCCCCCG。

表1 PCR扩增的引物序列、扩增片段长度及复性温度

Table 1 Primers sequence, length of products and annealing temperature used for PCR amplification

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5' 3')	扩增片段长度 Length of products(bp)	复性温度 Annealing temperature()
启动子 1 Promoter1	[GC]-GCTGCGAAGAGGGGAGAT / CCGACCCCGAGGAGAAAC	225	57
启动子 2 Promoter2	[GC]-CCCAGCTTCCTCTGTTTT / CCACATCTCCCTCTTCG	33	54
启动子 3 Promoter3	[GC]-TGGAGGAAGGCATTGAT / ACAGAGGAAGCTGGGAAT	219	57
启动子 4 Promoter4	[GC]-CTGTGCTGGGAAGGAGGGT / GAGAAACATGACTAGGTGGC	265	56
内含子 1 A Intron1 A	[GC]-CCGGCTCCTGCTCCTCTTA / CCCATCTTCGACGTGCTTTC	394	58
内含子 1 B Intron1 B	[GC]-CCGTGGGATGATTCAATAGG / AAGTCCGCAATAGTCCAGAA	442	59
内含子 1 C Intron1 C	[GC]-CCCCATTGCTTAGCGTTGC / AGTGGCTTGCGTGGTAGAG	382	56
内含子 1 D Intron1 D	[GC]-GGGCTGAGGTTGGAGTTG / CGTTCTGTACGCAGGTGATT	298	55

PCR反应体系: 基因组DNA约 40 ng, 10×反应缓冲液(MgCl₂ 15 mmol/L)2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2.0 μL, 上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL, *Taq*酶 2 U, 无菌水定容至 25 μL。循环参数: 94 预变性 5 min, 94 变性 45 s, 复性温度复性 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 35 次, 72 延伸 10 min。所有PCR产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测确认。

1.2.2.3 DGGE 检测

制备变性梯度聚丙烯酰胺凝胶, 使变性浓度在 20%~80% 的范围内自上而下呈线性增加(100% 的变性剂为 40% 去离子甲酰胺和 7 mol/L 尿素), 并根据电泳带形及其位置进一步调节变性浓度范围及电泳时间。电泳后, 下胶, EB 染色, 在紫外灯下观察结果。

2 结果与分析

2.1 *COL1A1* 基因半定量 RT-PCR 结果

ICTEV 患儿下肢肌肉、肌腱组织 *COL1A1* 基因与 β -actin 基因平均密度(average density value, ADV) 比值为 0.560 ± 0.127 , 相应正常组织二者比值为 0.133 ± 0.061 , 经统计学分析, 两组差异显著 ($P < 0.05$), ICTEV 患儿肌肉及肌腱组织中 *COL1A1* 基因表达水平高于正常组织($t = 12.680$, $P < 0.05$)。图 1 示 RT-PCR 电泳结果, 可见 ICTEV 患儿组织中 *COL1A1* 基因表达上调。

2.2 DGGE 检测结果

分别对 84 名 ICTEV 患者的各对引物的 PCR 产

物进行 DGGE 筛查, 发现一名患者启动子 1 的 DGGE 带形与正常人及其父母不同, 经 DNA 测序证实为-161(C→T)的杂合变异。发现另一名患者内含子 1 A 的 DGGE 带形与正常人及其父母不同, 经 DNA 测序证实为+274(C→G)的纯合变异。分别经过对 100 名正常人的同一位点进行筛查, 没有发现相同的改变, 因此排除其为多态位点。经查找人类基因突变数据库, 证实是尚未见报道的新变异。启动子 1 DGGE 电泳结果及该患者和正常人测序结果见图 2, 内含子 1 A 的 DGGE 电泳结果及该患者和正常人测序结果见图 3。

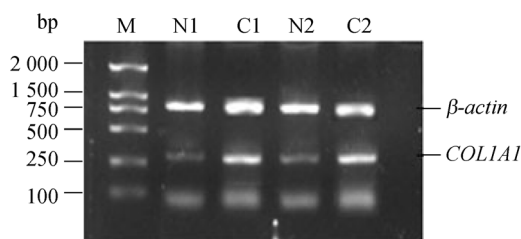


图1 *COL1A1* 基因在 ICTEV 患儿下肢和正常对照肌肉、肌腱组织表达结果

M: DL2000 marker; C1: ICTEV 患儿肌肉组织; C2: ICTEV 患儿肌腱组织; N1: 正常对照肌肉组织; N2: 正常对照肌腱组织。

Fig. 1 The expression of *COL1A1* gene in muscular, tendon tissues of ICTEV and normal controls

M: DL2000 marker; C1: Muscular tissues of ICTEV; C2: Tendon tissues of ICTEV; N1: Paired normal muscular tissues; N2: Paired normal tendon tissues.

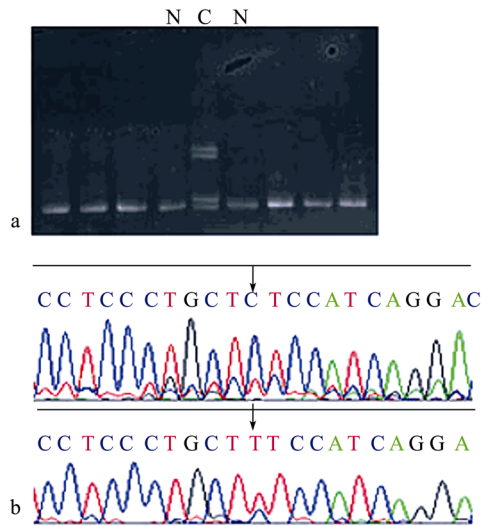


图 2 启动子 1 变异患者及正常人的 DGGE 电泳图(a) 及测序结果(b)

a: N 为正常人; C 为患者。b: 上图为正常对照测序图; 下图为患者测序图; 箭头示变异的碱基。

Fig. 2 DGGE result of promoter 1 (a) and the DNA sequence result of promoter 1 (b)

a: N shows normal control; C shows the patient. b: The upper figure shows sequence of normal control; Lower figure shows sequence of the patient; Arrow shows the base of mutation.

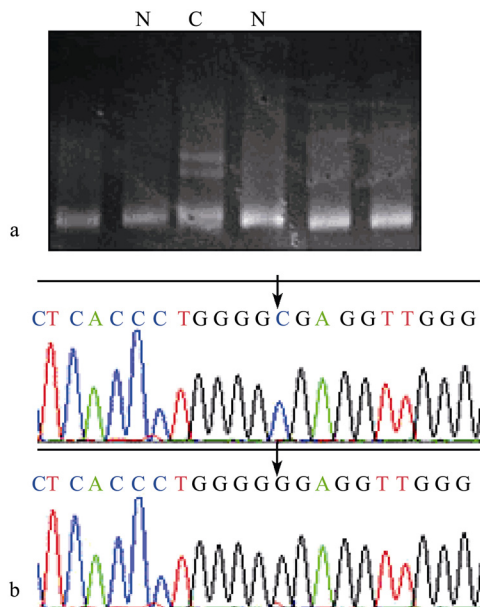


图 3 内含子 1 A 变异患者及正常人的 DGGE 电泳图(a) 及测序结果(b)

a: N 为正常人; C 为患者。b: 上图为正常对照测序图; 下图为患者测序图; 箭头示变异的碱基。

Fig. 3 DGGE result of intron 1 A (a) and the DNA sequence result of intron 1 A (b)

a: N shows normal control; C shows the patient. b: The upper figure shows sequence of normal control; Lower figure shows sequence of the patient; Arrow shows the base of mutation.

3 讨论

1980 年, Ippolito^[8]通过对 4 例马蹄内翻足流产胎儿进行解剖学和组织学研究, 证实小腿腓肠肌和结缔组织中纤维组织明显增加, 首次提出软组织挛缩导致马蹄内翻足畸形的理论。2004 年, 赵东风等^[9,10]对 15 例 ICTEV 患者及对照组 5 例非神经、肌肉及胶原病死亡小儿, 足内侧及小腿前外侧深筋膜进行透射电镜观察和免疫组化研究, 发现 ICTEV 挛缩侧、型胶原含量均有所增加, 型胶原增加最显著, 型次之, 型增加最少。表明细胞间质胶原的改变, 符合组织器官纤维化及一般瘢痕性纤维结缔组织增生, 故认为单纯性马蹄内翻足可能为足内侧的纤维化所引起。但是对于型胶原基因与 ICTEV 相关性的进一步研究至今仍未见报道。

我们应用半定量 RT-PCR 方法, 对 20 例 ICTEV 患儿患侧和正常对照的肌肉及肌腱组织进行 mRNA 水平表达研究发现, 马蹄内翻足患儿患侧肌肉及肌腱组织中 *COL1A1* 基因表达水平高于正常组织($t=12.680$, $P<0.05$), 说明 *COL1A1* 基因表达上调与先天性马蹄内翻足发生具有相关性。我们推测其具体机制可能为: 胎儿下肢发育早期 *COL1A1* 基因表达高于正常水平,

型胶原大量合成并沉积于肌肉、肌腱等结缔组织中, 形成了局部纤维化, 纤维挛缩产生持续的牵拉力量, 破坏了生理性肌力平衡, 使足被牵拉逐渐形成马蹄内翻足畸形。ICTEV 患儿在出生前畸形已经形成, 出生后持续的纤维增生、挛缩导致畸形逐渐加重, 且软组织松解术后畸形的复发率高。

为了深入探讨 *COL1A1* 基因表达上调的原因, 我们选择了前人报道的 *COL1A1* 基因转录因子结合位点相对集中, 在 *COL1A1* 基因转录调控中起重要作用的转录起始位点上游 -1 031 bp ~ +30 bp 和第 1 内含子对 84 名 ICTEV 患者进行 PCR-DGGE 突变筛查。结果发现 2 名患者的 DGGE 带型与正常人及其父母均不相同, 经 DNA 测序证实为 1 名患者 -161 bp 处存在 C T 的杂合变异, 另 1 名患者 +274 bp 处存在 C G 的纯合变异, 分别经过对 100 名正常人的同一位点进行筛查, 没有发现相同的改变, 排除了其为多态位点。经查找人类基因突变数据库, 证实是尚未见报道的新变异。我们使用 MatchTM 软件和 Alibaba2 软件预测, 在 -182 bp ~ -172 bp、+266 bp ~ +279 bp、+275 bp ~ +284 bp 和 +289 bp ~ +303 bp 处存在 Sp1 结合序列。近年来, 对 *COL1A1* 基因启动子活性研究表明: *COL1A1* 基因启动

子含有TGF β 反应元件(transforming growth factor beta responsive element, TbRE), 定位于转录起始点-174~-84 bp之间, 这是TGF β 对启动子产生作用的基础^[11]。TGF β 是一种多功能的细胞因子, 是 型胶原相关的生理、病理进程中的重要调节者, 并与基因表达高度相关。病理条件下, TGF β 通过提高多种核转录因子与 型胶原基因相应识别序列的结合活性, 促使 型胶原基因激活并高水平转录^[12,13]。诸多重要的转录因子如Sp1、Sp3、Ap1、CBF等与 型胶原基因转录调控有关。Sp1 是核转录因子中参与 型胶原基因激活的重要核蛋白, 也是TGF 诱导的 型胶原高水平转录的重要介导核因子。由此推测, 由于变异的存在不仅导致新的Sp1 结合序列产生, 并且增高了Sp1 与变异位点临近的Sp1 结合序列的亲合力, 促使COL1A1 基因激活并高水平转录。Sp1 与Sp1 结合序列亲和力的提高又诱导了TGF β 与TbRE结合活性增高, 从而促使COL1A1 基因高度表达。我们的研究提示, COL1A1 基因上游转录调控序列和第 1 内含子中的两处变异与 ICTEV 的发生高度相关, 但其具体作用机制尚不清楚。

参考文献(References):

- [1] LIU Li-Ying, LI Lian-Yong, WANG Li-Li, ZHANG Xuan, JI Shi-Jun, ZHANG Li-Jun, JIN Chun-Lian, SUN Kai-Lai. Case-control study of idiopathic talipes equinovarus in Northeast region of China. *Chin J Public Health*, 2006, 22(7): 831-862.
刘丽英, 李连永, 王莉莉, 张炫, 吉士俊, 张力军, 金春莲, 孙开来. 东北地区先天性马蹄内翻足的病例对照研究. *中国公共卫生*, 2006, 22(7): 831-832.
- [2] Chapman C, Stott NS, Port RV, Nicol RO. Genetics of clubfoot in Maori and Pacific people. *J Med Genet*, 2000, 37(9): 680-683. [\[DOI\]](#)
- [3] WANG Li-Li, JIN Chun-Lian, LIU Li-Ying, ZHANG Xuan, JI Shi-Jun, SUN Kai-Lai. Analysis of association between 5 HOXD gene and idiopathic congenital talipes equinovarus. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2005, 22(6): 653-656.
王莉莉, 金春莲, 刘丽英, 张炫, 吉士俊, 孙开来. 5 HOXD 基因与单纯性马蹄内翻足的相关性分析. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22(6): 653-656.
- [4] ZHANG Xuan, JIN Chun-Lian, LIU Li-Ying, ZHAO Ning, ZHANG Li-Jun, JI Shi-Jun, SUN Kai-Lai. Association and mutation analysis of GLI3 gene in idiopathic congenital talipes equinovarus. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2006, 23(5): 551-554.
张炫, 金春莲, 刘丽英, 赵宁, 张立军, 吉士俊, 孙开来. GLI3 基因与单纯性马蹄内翻足的关联分析及其突变筛. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23(5): 551-554.
- [5] LIU Li-Ying, JIN Chun-Lian, CAO Dong-Hua, ZHAO Ning, LIN Chang-Kun, SUN Kai-Lai. Analysis of association between COL9A1 gene and idiopathic congenital talipes equinovarus. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(4): 427-432.
刘丽英, 金春莲, 曹东华, 赵宁, 林长坤, 孙开来. COL9A1 基因与先天性马蹄内翻足的相关性研究. *遗传*, 2007, 29(4): 427-432.
- [6] Hecht JT, Ester A, Scott A, Wise CA, Iovannisci DM, Lammer EJ, Langlois PH, Blanton SH. NAT2 variation and idiopathic talipes equinovarus (clubfoot). *Am J Med Genet A*, 2007, 143(19): 2285-2291.
- [7] Retief E, Parker MI, Retief AE. Regional chromosome mapping of human collagen genes alpha 2(I) and alpha 1(I) (COLIA2 and COLIA1). *Hum Genet*, 1985, 69(4): 304-308. [\[DOI\]](#)
- [8] Ippolito E, Ponseti IV. Congenital clubfoot in the human fetus. *J Bone Joint Surg Am*, 1980, 62 (1): 8-22.
- [9] ZHAO Dong-Feng, YUE Yong, ZHAO Li, GE Jie, YANG Bai. Observation of ultrastructure on deep fascia in patients with congenital clubfoot. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitative*, 2004, 8(8): 1504-1505.
赵东风, 岳勇, 赵黎, 葛杰, 杨柏. 先天性马蹄内翻足患者深筋膜超微结构观察. *中国临床康复*, 2004, 8(8): 1504-1505.
- [10] ZHAO Dong-Feng, YUE Yong, HUANG Yao-Tian, ZHAO Li, GE Jie, YANG Bai. The observation of immunohistochemistry with collagen polyaccharide on deep fasciae of congenital clubfoot. *Chinese Journal of Pediatric Surgery*, 2004, 25(2): 182-184.
赵东风, 岳勇, 黄耀添, 赵黎, 葛杰, 杨柏. 先天性马蹄内翻足深筋膜胶原的免疫组化研究. *中华小儿外科杂志*, 2004, 25(2): 182-184.
- [11] Junien C, Huerre C, Rethore MO. Direct gene dosage determination in patients with unbalanced chromosomal aberrations using cloned DNA sequences. Application to the regional assignment of the gene for alpha 2(I) procollagen (COLIA2). *Am J Hum Genet*, 1983, 35(4): 584-591.
- [12] Inagaki Y, Truter S, Tanaka S, Di Liberto M, Ramirez F. Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta on alpha2(I) collagen transcription. *J Biol Chem*, 1995, 270(7): 3353-3358. [\[DOI\]](#)
- [13] Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. SP1 binding activity increases in activated I to cells. *Hepatology*, 1995, 22(1): 241-251.