

GLI3、EN1 基因在单纯性马蹄内翻足发生中的功能研究

曹东华^{1, 2}, 王谦¹, 林长坤¹, 王正东¹, 张炫¹, 金春莲¹

1. 中国医科大学基础医学院医学遗传学教研室, 沈阳 110001;

2. 中国人民解放军第二〇二医院检验科, 沈阳 110003

摘要: 为了探讨人类 *GLI3* 基因在单纯性马蹄内翻足 (Idiopathic congenital talipes equinovarus, ICTEV) 发生时所起的作用, 文章构建了大鼠 *Gli3* 基因启动子区域荧光素酶报告基因表达载体来分析 *Gli3* 基因启动子的活性, 并利用 P-match 软件预测大鼠 *Gli3* 基因启动子区域可能的调控元件, 应用 CHIP 实验加以验证。并利用 RT-PCR、免疫组化和 Western blotting 的方法分析大鼠 *En1* 与 ICTEV 的相关性。经 P-match 软件预测, *Gli3* 基因启动子区域有 3 个转录因子 En1 的可能结合位点, 经 CHIP 实验证实位点 1 是真正结合位点。RT-PCR、免疫组化和 Western blotting 方法都证实 *En1* 基因在马蹄内翻足模型鼠中表达下降。研究结果提示大鼠的转录因子 En1 可能是 *Gli3* 基因的上游负调控元件。在 ICTEV 患者中, 很可能是由于 *EN1* 基因表达水平的下降导致了 *GLI3* 基因表达水平的上升, 最终导致 ICTEV 的发生。

关键词: *GLI3* 基因; *EN1* 基因; 单纯性马蹄内翻足

The functions of *GLI3* and *EN1* genes in idiopathic congenital talipes equinovarus

CAO Dong-Hua^{1,2}, WANG Qian¹, LIN Chang-Kun¹, WANG Zheng-Dong¹, ZHANG Xuan¹, JIN Chun-Lian¹

1. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China;

2. No.202 hospital of People's Liberation Army, Shenyang 110003, China

Abstract: To investigate the role of gene *Gli3* in idiopathic congenital talipes equinovarus (ICTEV), we constructed the *Gli3* luciferase reporter gene expression vectors to analyze the promoter activity of the rat gene *Gli3*. The regulatory element in the promoter region of the rat *Gli3* was predicted using P-match software and further verified by CHIP experiment. Meanwhile, the correlation between the rat *En1* and ICTEV was evaluated by RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blotting analyses. The result from P-Match software prediction showed that only one of the three possible En1 binding sites in *Gli3* promoter region was interacted directly with En1 *in vivo*, which was confirmed by CHIP analysis. The results from RT-PCR, immunohistochemistry and

收稿日期: 2009-05-04; 修回日期: 2009-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30973140)资助

作者简介: 曹东华(1974-), 男, 主管技师, 博士研究生, 研究方向: 遗传病的分子遗传学。Tel:13019333266;
E-mail:dhcao427@sina.com

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

Western blotting analyses suggested that *En1* was down-regulated in ICTEV model rats compared to the controls. Our results indicated that *En1* might be the negative regulatory element in the upstream of *Gli3*. The low expression level of *EN1* in ICTEV could contribute to the up-regulation of *GLI3*, which led to the genesis of ICTEV.

Keywords: *GLI3*; *EN1*; idiopathic congenital talipes equinovarus (ICTEV)

单纯性马蹄内翻足(Idiopathic congenital talipes equinovarus, ICTEV)是较为常见的危害儿童健康的先天畸形之一,其发病率大约为 1%~8%^[1]。患儿一出生即表现跟骨下关节内翻,跗骨关节内收,形成足前部内收,足后部内翻,跖骨旋后,踝关节下垂成马蹄足状^[2]。目前对于人类ICTEV的发病机制还知之不多,多数学者认为,ICTEV的发生可能与多种易感基因和环境影响因素有关^[1]。

GLI3 是参与早期肢体发育的重要转录因子之一,已证实与指(趾)的发育密切相关,但是否与ICTEV的发生相关国内外未见报道。我室前期以ICTEV核心家系为研究对象,通过SNP关联分析的方法发现*GLI3* 基因与ICTEV的发生可能相关^[3]。Logan 等^[4]报道*EN1* 基因的突变也会造成指的结构发生变化,而这两个基因同在极化活性区(Zone of polarizing activity, ZPA)表达。为了探讨这两个基因之间是否相互作用,以及二者的相互作用是否与ICTEV的发生相关,本研究构建了大鼠ICTEV动物模型,对大鼠*En1* 表达水平和*Gli3* 调控机制进行了研究,为ICTEV的发病机制和病因学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象

Wistar 大鼠,鼠龄 70~90 d,体重 220~230 g,清洁级,由中国医科大学动物部提供。

1.1.2 试剂

全反式维甲酸(all trans-retinoic acid, ATRA)及矿物油购自 Sigma 公司(美国);逆转录PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司(日本);免疫组化试剂盒购自上海天呈科技有限公司(中国);核蛋白提取试剂盒购自 Active Motif 公司(美国);CHIP 试剂盒购自 Active Motif 公司(美国);EMSA 试剂盒购自 Pierce 公司(美国);羊抗兔 En1 抗体购自 Sigma(美国);羊抗兔 Sox9 抗体购自 Santa Cruz(美国)。

1.2 方法

1.2.1 荧光素酶报告基因表达载体的构建

为了分析大鼠 *Gli3* 基因启动子区域的启动子活性, 我们利用 Primer5 软件设计了 4 对引物。其共用 Forward 引物在 *Gli3* 基因转录起始点上游-645 bp 的位置, 而 Reverse 引物在转录起始点上游及第一外显子上, 并依次截短。将这几段序列克隆之后, 连接于 pGL-3 荧光素酶报告基因表达载体上, 来分析这几段区域的启动子活性。如图 1 所示, 这几段序列的长度分别为 145 bp(Luc-500, -645~-500)、437 bp(Luc-208, -645~-208)、544 bp(Luc-101, -645~-101)、747 bp(Luc+102, -645~+102)。引物序列见表 1。25 μ L PCR 反应体系包括: 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 引物各 20 pmol, *Taq* DNA 聚合酶 1.25 U, 50 ng DNA, 用水补齐至 25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后, 连接于 pMD18-T 载体上, 经 *Kpn*I 和 *Hind*III 双酶切后连接于 PGL-3 荧光素酶报告基因上, 由上海生工生物工程技术有限公司测序。将 12 μ g PGL-3 和 0.1 μ g pRL-TK(转染效率的内参)瞬时转染于大鼠成肌细胞系中, 24 h 后测荧光素酶活性。

1.2.2 *Gli3* 基因启动子区域分析

利用 P-Match 软件对大鼠 *Gli3* 基因启动子区域进行分析(<http://www.gene-regulation.com>), 寻找感兴趣的调控元件。

1.2.3 染色质免疫沉淀 (CHIP)

CHIP 实验是研究转录调控蛋白和相应核苷酸序列结合的常用方法, 能真实、完整地反映结合在 DNA 序列上的调控蛋白。取 5 只孕 14 d 正常胎鼠下肢置于 PBS 缓冲液中, 匀浆处理后严格按照 CHIP 试剂盒操作步骤进行操作。实验管加入 8 mg En1 抗体, 阴性对照管中加入 8 mg Sox9 抗体。4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, 用 CHIP 清洗液清洗 3 遍, 65 $^{\circ}$ C 反交联 5 h, 离心取上清, 加入蛋白酶 K, 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 回收 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。同时以 Input DNA 为模板进行 PCR 扩增, 来验证胎鼠下肢中是否有 *Gli3* 基因表达; 以大鼠基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 作为 PCR 实验阳性对照。PCR 体系同 1.2.1, 复性温度为 59 $^{\circ}$ C, 复性时间为 1 min, 预期产物分别为 264 bp(包含 En1 预测位点 1)和 237 bp(包含 En1 预测位点 2 和 3)。CHIP 实验所用 PCR 引物序列见表 1。

1.2.4 ICTEV 大鼠模型的建立

ICTEV 大鼠模型的建立参照文献[5]。

1.2.5 *En1* 基因的 RT-PCR 检测

取孕 14 d ICTEV 模型胎鼠和正常对照组胎鼠各 5 只, 按常规方法提取下肢足踝部组织总 RNA。严格按反转录试剂盒操作说明反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 β -actin 作为内参, 检测 *En1* 基因的表达情况。PCR 体系同 1.2.1, 复性温度为 59℃。 *En1* 基因预期产物大小为 255 bp, β -actin 预期产物大小为 389 bp。产物经 1.5 % 琼脂糖胶电泳, 用 AlphaImage 2000 自动成像仪 (Alpha Innotech Corp., San Jose, CA) 摄影, 用 Fluorchem v 2.0 Stand Alone 软件分析 RT-PCR 产量。经 *t* 检验进行统计分析。

1.2.6 免疫组化

取孕 14 d 的 ICTEV 模型胎鼠和正常对照组胎鼠各 5 只。将胎鼠下肢用中性甲醛固定, 并用石蜡包埋切片。切片常规脱蜡入水, 严格按照试剂盒操作规程进行免疫组化实验。 *En1* 主要为细胞质染色, 阳性细胞胞浆中存在棕黄色颗粒。每张切片选取 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算阳性细胞发生率。经 *t* 检验进行统计分析。

1.2.7 Western blotting

取孕 14 d ICTEV 模型胎鼠和正常对照组胎鼠各 5 只, 所有模型胎鼠和正常对照胎鼠下肢分别收集于一管, 严格按照蛋白提取试剂盒的操作要求提取蛋白。应用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 电转至 PVDF 膜上。3% BSA 封闭后, 于 1: 200 稀释的 *En1* 抗体孵育 3 h, 再用 1: 4000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育 2 h, ECL 显色。

2 结果与分析

2.1 *Gli3* 基因启动子区域依次截短荧光素酶报告基因表达载体的构建及活性分析

如图 1 所示, 我们构建了 4 个 *Gli3* 基因启动子区域依次截短的荧光素酶报告基因载体, 经测序证实连接片段与预期相符, 且连接方向正确。 *Gli3* 基因转录起始点上游启动子区域依次截短的几个部分荧光素酶活性结果见图 2。可见 Luc-208 与 Luc-500 段相比, 活性下降为 1/3, 证明在 -500 bp 与 -208 bp 之间可能存在负调控元件; Luc-101 与 Luc-208 相比活性上升 8 倍左右, 证明 -208 bp 与 -101 bp 之间可能存在很强的正调控元件; 同理, -101 bp 与 +102 bp 之间可能存在弱的正调控元件。

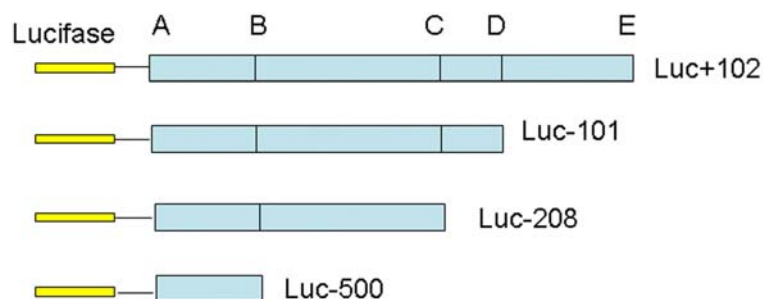


图 1 大鼠 *Gli3* 基因启动子区域构建依次截短的荧光素酶报告基因

各个依次截短的荧光素酶报告基因长度分别为 145 bp(Luc-500)、437 bp(Luc-208)、544 bp(Luc-101,)、747 bp(Luc+102)。

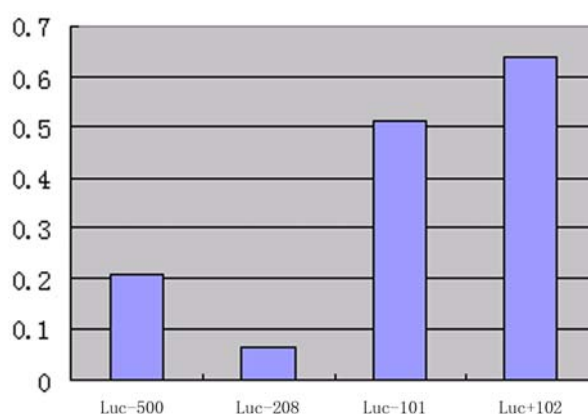


图 2 大鼠 *Gli3* 基因启动子区域构建依次截短的荧光素酶相对活性分析

2.2 转录因子结合位点的预测

利用 P-match 软件对 *Gli3* 基因转录起始点上游 1 000 bp 进行转录因子结合位点分析, 如图 3 所示, 结果发现 3 个可能的转录因子 En1 结合位点, 分别位于 -500 bp~-208 bp、-208 bp~-101 bp、-101 bp~+102 bp 之间, 分别命名为位点 1、位点 2、位点 3。



图 3 大鼠 *Gli3* 基因启动子区域转录因子 En1 结合位点

小写黑色字母为 *Gli3* 基因转录起始点上游 696 bp 的序列; 小写红色字母分别为 *Gli3* 基因转录起始点上游 696 bp 范围内的 3 个 En1 结合位点的核心序列; 大写字母为 *Gli3* 基因第一外显子序列。

2.3 染色质免疫沉淀 (CHIP) 试验结果

如图 4 所示, 以 Input DNA 为模板进行 PCR 扩增后有目的片段, 说明在大鼠胎鼠下肢中有 *Enl* 基因的表达, 以大鼠基因组 DNA 为模板扩增出目的片段, 说明 PCR 实验有效。实验组有目的片段而阴性对照组无目的片段, 说明 *Enl* 抗体特异。经位点 1 引物 PCR 扩增后有目的片段 (泳道 1), 而位点 2、3 引物 PCR 扩增后无目的片段 (泳道 5), 可以判断转录因子 *Enl* 只结合于位点 1 上。

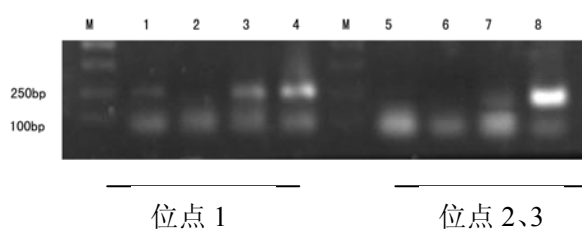


图 4 CHIP 实验结果

M: DL2000 Marker; 1、5: 加 *Enl* 抗体组, PCR 扩增后只有泳道 1 有目的片段 (264bp); 2、6: 加入 *Sox9* 抗体的阴性对照组; 3、7: Input 组; 4、8: 用基因组 DNA 作模板的 PCR 阳性对照组。

2.4 RT-PCR 分析 *Enl* 表达情况

ICTEV模型胎鼠下肢*Enl*基因与 β -actin基因平均密度 (ADV) 比值为 0.075 ± 0.013 ; 正常对照胎鼠下肢*Enl*基因与 β -actin基因平均密度 (ADV) 比值为 0.253 ± 0.045 。经*t*检验, 两组差异显著 ($t=5.205$, $P<0.01$), ICTEV模型胎鼠下肢*Enl*基因表达低于正常对照胎鼠下肢, 表达明显下调 (图 5)。

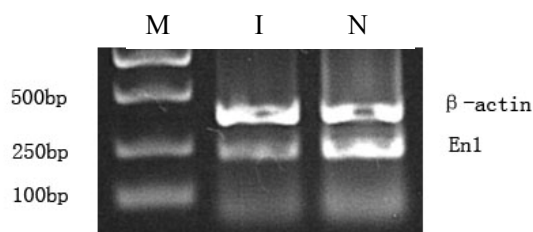


图 5 孕 14 d 正常胎鼠和 ICTEV 模型胎鼠下肢 *Enl* 基因 RT-PCR 结果

M: DL2000 Marker; N: 正常胎鼠对照组; I: ICTEV 模型胎鼠组。

2.5 免疫组化分析 En1 表达情况

En1 蛋白主要位于胞浆, 表现为棕黄色颗粒, 呈弥漫性全浆表达。正常胎鼠阳性细胞呈片状分布, 表现为全浆型 (图 6N), 阳性率为 $(85.3 \pm 5)\%$ 。而模型胎鼠的 En1 蛋白表达明显下调, 而且棕黄色颗粒较小 (图 6I), 阳性率为 $(48.7 \pm 6)\%$, 显著低于对照组 ($t=3.326$, $P<0.01$)。

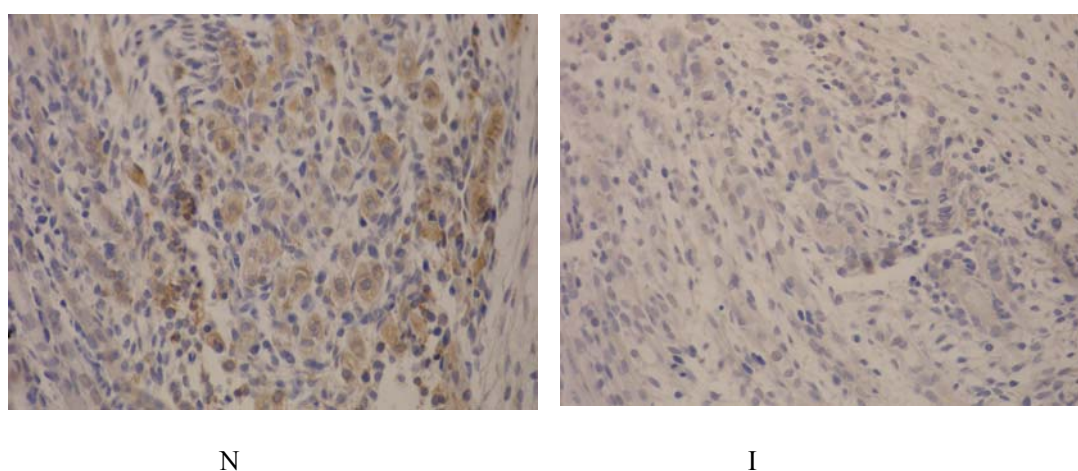


图 6 孕 14 d 正常胎鼠和 ICTEV 模型胎鼠下肢 En1 蛋白免疫组化结果

N: 正常胎鼠对照组; I: ICTEV 模型胎鼠组。

2.6 Western blotting 分析 En1 表达情况

如图 7 所示, 模型胎鼠与正常对照胎鼠相比, ICTEV 模型胎鼠下肢的 En1 蛋白表达明显下调。

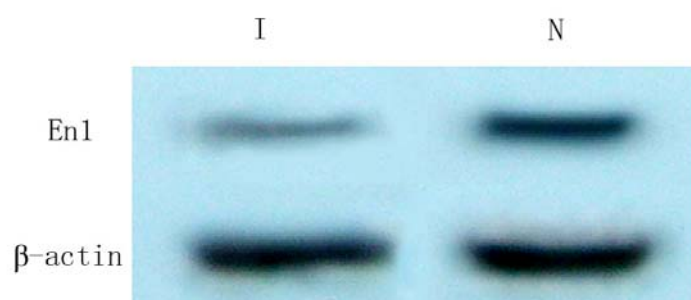


图 7 孕 14 d 正常胎鼠和 ICTEV 模型胎鼠下肢 En1 蛋白 Western blotting 结果

I: ICTEV 模型胎鼠组; N: 正常胎鼠对照组。

3 讨论

单纯性马蹄内翻足是常见的严重危害儿童健康的先天畸形之一,其发病机制目前仍不是很清楚。关于ICTEV的发病原因,国内外的研究争论很多。曾提出多种观点,如骨骼发育异常,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,但均缺乏有力的证据^[6-8]。通过对双胞胎的研究及复合分离分析,提示遗传因素与ICTEV的发病相关。大量的证据强烈提示ICTEV的发病与目前尚不清楚的致畸基因相关^[9]。

ICTEV的遗传基础虽然比较肯定,但其致病基因的鉴定却进展缓慢。人类胚胎在孕 12 周时已能通过超声检查识别出ICTEV症状^[10]。其致病基因必然是在此之前就发生异常表达,并与骨骼、软骨、肌肉、神经的发育相关,特别是与足踝部发育相关。已知的与下肢发育相关的基因有*DTDST*、*COL9A1*、*FGF*、*SHH*、*WNT*、*EN-1*、*LMX-1*、*GLI1*、*GLI3*、*HOXD*、*BMP*等^[11],可以通过对ICTEV致病基因的定位及功能鉴定对其发生做进一步的研究。

在肢体发育的早期,肢体远端沿前后轴的发育主要是受其后端间充质内ZPA的调控。而转录因子GLI3 是该区域内的信号分子之一,它可以沿肢体前后轴方向限定各个基因表达的区域边界,这为建立肢体不对称模式提供了必要的位置信息^[12]。目前的研究认为, GLI3 作为SHH- GLI3 信号通路中的关键环节来发挥作用。在肢体发育的过程中, *GLI3* 基因能确定指(趾)的数目。至今已有很多报道表明, *GLI3* 基因突变可导致多种先天畸形,而这些综合征均表现有肢体特别是指(趾)的数目及形态畸形。如Greigs综合征和Pallister-Hall综合征等,二者的相关基因都被定位于 7p13,随后又都被证实与*GLI3* 基因相关。本课题组前期通过应用SNP关联分析方法证实了*GLI3* 基因与ICTEV相关^[3]。进一步应用RT-PCR检测ICTEV患者和正常对照的足踝部肌肉中*GLI3* 基因的表达,结果未检测到*GLI3* 基因的表达,提示出生后*GLI3* 基因在足踝部的表达可能关闭,该基因很可能只在胚胎时期在足踝部发挥作用。大鼠胚胎中*Gli3* 基因于孕 12.5 d表达达到高峰^[13],结合取材的需要,我们选择孕 14 d胎鼠作为研究对象。RT-PCR分析、免疫组化及Western blotting等实验均提示,与正常对照胎鼠相比, *Gli3* 基因在ICTEV模型胎鼠下肢发育的各个时期表达均上调,进一步证明了*Gli3* 基因与ICTEV畸形发生可能相关。而且随着出生的临近,该基因在ICTEV模型胎鼠和正常对照胎鼠下肢的表达都逐渐下降,这也提示很可能出生后*Gli3* 基因在足踝部的表达即关闭(数据未发表)。但在ICTEV模型胎鼠中*Gli3* 基因的表达水平变化的机制还不是很清楚。为了探讨促使

Gli3 基因表达水平变化的原因, 我们构建了 *Gli3* 基因启动子区域依次截短的荧光素酶报告基因表达载体。转入大鼠成肌细胞后, 测其荧光素酶活性, 结果提示在 -500~-208 bp 范围内可能存在负调控元件, 在 -208~-101 bp 范围内可能存在强的正调控元件, 在 -101~+102 bp 范围内可能存在弱的正调控元件。我们推断很可能是在 *Gli3* 基因启动子区域存在一些调控元件, 与 *Gli3* 基因的上游转录因子结合, 调控 *Gli3* 基因的表达。为了寻找影响 *Gli3* 启动子活性的调控元件, 我们利用 P-match 软件对大鼠 *Gli3* 基因转录起始点上游 1 000 bp 的序列上的转录因子结合位点进行了预测, 结果发现有 3 个可能的转录因子 En1 结合位点。

在肢芽形成的早期阶段, *En1* 基因的 mRNA 和蛋白质就均匀分布在整个腹侧肢芽外胚层中。EN1 是参与下肢发育的一个重要转录因子, 它的功能缺失将导致尖端外胚层脊 (Apical ectodermal ridge, AER) 区域的扩大, 从而影响正常的肢体形成。而且 *EN1* 功能的缺失也会造成爪的结构发生变化, 这与 *GLI3* 基因的功能有相似之处。P-match 软件预测 *Gli3* 基因转录起始点上游有 3 个 En1 结合位点, 由此我们分析 *En1* 基因很可能是 *Gli3* 基因的上游调控转录因子。为了确定哪一个或哪几个位点是真正的转录因子 En1 结合位点, 我们应用染色质免疫沉淀实验进行检测, 结果证实只有位点 1 是真正的 En1 结合位点。En1 结合位点 1 位于 *Gli3* 基因转录起始点上游 -500~-208 bp 范围内的负调控元件区域 (荧光素酶报告基因分析结果), 表明 *Gli3* 基因表达过程中, En1 很可能是一个负调控的转录因子。

为了进一步明确 *En1* 基因与 ICTEV 发生的相关性, 我们又对 *En1* 基因在 ICTEV 模型大鼠胎鼠下肢的表达情况进行了研究, 结果发现, 不论在 mRNA 水平, 还是在蛋白质水平, ICTEV 模型胎鼠中 *En1* 基因的表达水平都明显下降, 差异显著。由于大鼠基因组与人类基因组高度同源, 所以人类疾病的大鼠模型可以基本上真实模拟人类疾病的发病过程。因此我们推测, 在人类 ICTEV 患者中, 很可能是由于 *EN1* 基因表达水平的下降, 导致 *GLI3* 基因表达水平的升高, 最终导致 ICTEV 的发生。

本文通过对 *En1* 基因在 ICTEV 模型胎鼠下肢的表达情况进行分析, 证实 *En1* 基因通过调控 *Gli3* 基因的表达参与 ICTEV 的发生。但 ICTEV 的发生很可能与多个基因相关^[14~18], 这些基因之间是否相互作用、相互影响, 是否存在一个影响肢体发育的网络还有待于深入研究。本课题组将就这些问题进一步探讨, 为研究 ICTEV 发生发展的分子机制奠定一定的理论基础。

参考文献 (References) :

- [1] Miedzybrodzka Z. Congenital talipes equinovarus (clubfoot): a disorder of the foot but not the hand. *J Anat*, 2003, 202(1): 37–42.
- [2] Cardy AH, Barker S, Chesney D, Sharp L, Maffulli N, Miedzybrodzka Z. Pedigree analysis and epidemiological features of idiopathic congenital talipes equinovarus in the United Kingdom: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord*, 2007, 8: 62.
- [3] 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查. 中华医学遗传学杂志, 2006, 3(5): 551–554.
- [4] Logan C, Hornbruch A, Campbell I, Lumsden A. The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development*, 1997, 124(12): 2317–2324.
- [5] 周海涛, 孙开来, 李增钢, 赵彦艳, 李岭, 吉士俊, 马瑞雪, 尚超, 李春义, 富伟能. 全反式维甲酸诱导大鼠胚胎马蹄内翻足模型. 中国公共卫生, 2004, 20(4): 413–415.
- [6] Rebbeck TR, Dietz FR, Murray JC, Buetow KH. A single gene explanation for the probability of having idiopathic talipes equinovarus. *Am J Hum Genet*, 1993, 53(5): 1051–1063.
- [7] Wynne-Davies R. Genetic and environmental factors in the etiology of talipes equinovarus. *Clin Orthop Relat Res*, 1972, 84: 9–13.
- [8] Chapman C, Stott NS, Port RV, Nicol RO. Genetics of clubfoot in Maori and Pacific people. *J Med Genet*, 2000, 37(9): 680–683.
- [9] Dietz F. The genetics of idiopathic clubfoot. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, 401: 39–48.
- [10] Keret D, Ezra E, Lokiec F, Hayek S, Segev E, Wientroub S. Efficacy of prenatal

ultrasonography in confirmed club foot. *J Bone Joint Surg Br*, 2002, 84(7): 1015–1019.

[11] Goodman FR. Limb malformation and the human HOX genes. *Am J Hum Genet*, 2002, 112(3): 256–265.

[12] McGlinn E, van Bueren KL, Fiorenza S, Mo R, Poh AM, Forrest A, Soares MB, Bonaldo Mde F, Grimmond S, Hui CC, Wainwright B, Wicking C. Pax9 and Jaggedl act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mech Dev*, 2005, 122(11): 1218–1233.

[13] Theil T, Kaesler S, Grotewold L, Böse J, Rüther U. *Gli* genes and limb development. *Cell Tissue Res*, 1999, 296(1): 75–83.

[14] 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.

[15] 王莉莉, 富伟能, 李增刚, 孙开来. HOXD13、FHL1和先天性马蹄内翻足的相关研究. 遗传, 2008, 30(1): 46–50.

[16] Wang LL, Fu WN, Li-Ling J, Li ZG, Li LY, Sun KL. HOXD13 may play a role in idiopathic congenital clubfoot by regulating the expression of FHL1. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 121(3-4): 189–195.

[17] 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相关性的研究. 遗传, 2007, 29(4): 427–432.

[18] 赵宁, 金春莲, 刘丽英, 曹东华, 林长坤, 吉士俊, 孙开来. COL1A1基因转录调控序列变异与单纯性马蹄内翻足的相关性. 遗传, 2008, 30(5): 1–5.

表 1 引物序列

名称	序列 (5'—3')	复性温度 (°C)
Lucifase Forward(公用引物)	TAA AGT TGA CCA CCA GAA	
Lucifase Reverse1	GTG TGC CGA AAG GGT TGT AAC GC	60
Lucifase Reverse2	GCC AGT CAA AGT CAC ACG CAG CT	60
Lucifase Reverse3	GCC CTT CTG CAT CTT CTG CCT GAG	60
Lucifase Reverse4	CAC GGC CTT CTC ACT GAC ATC TGT	60
CHIP site1: Forward	AAC CCT TTC GGC ACA CTT CTG	59
CHIP site1 Reverse	GAC CCC AGG CTT TGC TAT CT	
CHIP site2/3: Forward	GCG TGT GAC TTT GAC TGG CTT C	59
CHIP site2/3 Reverse	GGG CCT CCA TAA TGT CTG CTC	
RT-PCR Forward	CCG CGA TCC TAC TCA TGG GTT C	59
RT-PCR Reverse	GCC GCT GCT CCG TGA TGT AG	
β-actin forward	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	59
β-actin reverse	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G	