

FHL1基因表达与先天性马蹄内翻足：15例患者及3名正常人的对比分析*☆◆

王莉莉¹, 辛娜², 孙开来²

FHL1 gene expression and idiopathic congenital clubfoot: Comparative analysis of 15 patients and 3 normal controls

Wang Li-li¹, Xin Na², Sun Kai-lai²

Abstract

BACKGROUND: Preliminary study shows that the FHL1 gene expression is down-regulated in muscle tissue of patients with clubfoot, and the gel retardation experiments have verified HOXD13 and FHL1 gene promoter region transcription factor predicted binding sites *in vitro*, but the experimental results are not enough to truly reflect *in vivo* transcriptional regulatory protein and DNA binding conditions.

OBJECTIVE: Western-blot technique is utilized to further validate FHL1 and HOXD13 gene expression in protein levels in muscle tissue of patients with congenital clubfoot, the *in vivo* HOXD13 and predicted binding sites in embryonic foot development was verified using chromatin immunoprecipitation technology.

METHODS: Muscle tissues were samples from 15 children with congenital clubfoot, in the Department of Pediatric Surgery, at the Second Affiliated Clinical Hospital of China Medical University, 3 copies of normal children foot muscle tissues at the same age were provided by the Forensic Medicine College of China Medical University, 1 case of aborted embryo at pregnancy 13 weeks were offered by Department of Obstetrics and Gynecology, at the Second Affiliated Clinical Hospital of China Medical University. All specimens used are given informed consents by the patients and their families. Western-blot method was applied to detect the expressions of HOXD13 and FHL1 in foot muscle tissue of 15 patients of congenital clubfoot and 3 normal children at the same age; The FHL1 gene upper stream HOXD13 binding sites was predicted using software, the interaction of HOXD13 and FHL1 during embryonic development was verified with chromatin immunoprecipitation experiment, brain tissue without HOXD13 protein expression served as controls.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with normal children foot muscle tissues, both HOXD13 gene (5/15) and FHL1 (7/15) were down-regulated in 15 patients of congenital clubfoot. An enrichment of the predicted HOXD13 binding site was observed in the precipitated human embryo foot tissues chromatin. No enrichment of the predicted site containing sequence was observed in the control brain chromatin; additionally, there was no enrichment of the control sequence. This study further verifies that, the FHL1 and HOXD13 gene expression are down-regulated in the foot muscle tissue of congenital clubfoot children patients; during development of human embryos, HOXD13 protein can bind with FHL1 promoter region binding sites to play its role in transcriptional regulation. It is indicated that in the human foot embryonic development, the down-regulation of HOXD13 expression may result in reduced expression levels of FHL1, thereby affecting the foot muscle growth and differentiation, leading to clubfoot deformity occurring.

Wang LL, Xin N, Sun KL. FHL1 gene expression and idiopathic congenital clubfoot: Comparative analysis of 15 patients and 3 normal controls. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(7): 1315-1318.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前期研究表明, 在马蹄内翻足患者肌肉组织中存在 FHL1 基因表达下调, 并利用凝胶阻滞实验在体外初步验证了 HOXD13 和 FHL1 基因启动子区转录因子预测位点的结合作用, 但凝胶阻滞实验结果不一定能真实地反映体内转录调控蛋白和 DNA 结合的状况。

目的: 应用 Western-blot 技术进一步验证先天性马蹄内翻足患者足部肌肉组织中 FHL1, HOXD13 基因蛋白质水平的表达, 应用染色质免疫沉淀技术验证在胚胎足部发育时在体内 HOXD13 和预测结合位点的结合作用。

方法: 15 份先天性马蹄内翻足患儿肌肉组织标本由中国医科大学附属第二临床医院小儿外科提供, 3 份同年龄组正常儿童足部肌肉组织由中国医科大学法医学院提供, 1 例孕 13 周流产胚胎由中国医科大学附属第二临床医院妇产科提供。所有标本使用均经患者及其家属知情并同意。应用 Western-blot 方法检测 15 例先天性马蹄内翻足患儿及 3 例同年龄组正常儿童足部肌肉组织 HOXD13 和 FHL1 表达情况; 并用软件预测 FHL1 基因上游 HOXD13 的结合位点, 染色质免疫沉淀实验验证胚胎发育时 HOXD13 和 FHL1 的相互作用, 以不表达 HOXD13 蛋白的脑组织作为对照。

结果与结论: 与同期正常儿童足部肌肉组织相比, 15 例先天性马蹄内翻足患儿肌肉组织中有 7 例存在 FHL1 基因蛋白质水平表达下调, 而这 7 例患儿中有 5 例同时存在 HOXD13 基因蛋白质表达下调。沉淀的人胚胎足部组织染色质中有预测 HOXD13 结合位点的扩增, 无对照位点的扩增, 对照脑组织中无预测位点的扩增。结果进一步验证显示了先天性马蹄内翻足患儿足部肌肉组织中 FHL1、HOXD13 基因表达下调; 人类胚胎肢体发育过程中 HOXD13 蛋白可以和 FHL1 启动子区的预测位点结合发挥其转录调节作用。提示在人胚胎足部发育时, HOXD13 表达下调导致了 FHL1 表达水平的下调, 进而影响了足部肌肉生长发育和分化导致马蹄内翻足畸形的发生。

关键词: 先天性马蹄内翻足; FHL1; 转录调控; HOXD13; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.07.041

王莉莉, 辛娜, 孙开来. FHL1 基因表达与先天性马蹄内翻足: 15 例患者及 3 名正常人的对比分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1315-1318. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Key Laboratory of Congenital Malformation, Department of Pediatric Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China;
²Department of Medical Genetics, Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Wang Li-li☆, Doctor, Assistant researcher, Key Laboratory of Congenital Malformation, Department of Pediatric Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
wll_1977_21@163.com

Supported by: the Sub-project of National Basic Research and Development Program of China, No. 2001CB510301*

Received: 2009-08-29
Accepted: 2009-09-25

1 中国医科大学附属盛京医院小儿外科先天性畸形重点实验室, 辽宁省沈阳市 110004; 2 中国医科大学基础医学院遗传教研室, 辽宁省沈阳市 110001

王莉莉^{*}, 女, 1977 年生, 黑龙江省安达市人, 汉族, 2008 年中国医科大学毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事先天性畸形发育遗传学研究。
wll_1977_21@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)07-01315-04

收稿日期: 2009-08-29
修回日期: 2009-09-25
(20090629017/GW·Y)

0 引言

先天性马蹄内翻的发病率在 0.1%~0.45%, 遗传因素在先天性马蹄内翻足的发病过程中发挥重要作用, 遗传度为 65%。但其遗传方式、外显率等均不清楚, 易感基因尚未确定^[1-5]。目前研究与先天性马蹄内翻足发病相关的基因主要集中在与足踝部的骨骼、软骨、肌肉和神经发育相关的基因, 如 COL9A1, CASP10, WNT7A, HOXD13 等^[6-10]。

很多研究已经表明, 先天性马蹄内翻足患足肌肉在大体上和微观机构上都存在改变。先天性马蹄内翻足是胎儿早期肌力不平衡的结果, 骨骼关节和软组织挛缩是继发于肌力不平衡的适应性改变。FHL1 基因定位于 Xq26, 高水平表达于骨骼肌和心肌组织中^[11-13]。Loughna 等^[14]研究表明, 失用性肌萎缩中该基因表达下调, 而在被动练习导致的肌肉肥大中该基因表达上调。FHL1 可通过抑制 integrin 介导的成肌细胞聚集而激活成肌细胞的扩散和迁移^[15]。先天性马蹄内翻足患者足部肌肉组织中是否存在 FHL1 基因的异常呢? 本科室前期应用半定量 RT-PCR 方法检测了先天性马蹄内翻足患者足部肌肉组织的 FHL1 的表达, 结果表明, 在马蹄内翻足患者肌肉组织中存在 FHL1 基因 mRNA 的表达下调; 为了探讨 FHL1 的转录调控机制, 作者利用软件预测了 FHL1 基因启动子区的转录因子结合位点, 结果在转录起始点上游 550~950 bp 预测到了 HOX 的结合位点并利用凝胶阻滞实验在体外初步验证了 HOXD13 和预测位点的结合作用^[16]。本实验进一步应用 Western-blot 技术检测了先天性马蹄内翻足患者足部肌肉组织中 FHL1, HOXD13 基因蛋白质水平的表达情况, 并应用染色质免疫沉淀技术验证了在胚胎足部发育时在体内 HOXD13 和预测结合位点的结合作用, 为揭示先天性马蹄内翻足的发病机制提供线索。

1 对象和方法

设计: 基因水平, 病例-对照观察实验。

时间及地点: 于 2006-07/2008-06 在中国医科大学基础医学院遗传教研室完成。

对象: 15 例先天性马蹄内翻足患儿肌肉组织标本由中国医科大学附属第二临床医院小儿外科提供, 患儿年龄 2~6 岁; 3 份同年龄组正常

儿童足部肌肉组织由中国医科大学法医学院提供, 1 例孕 13 周的流产胚胎由中国医科大学附属第二临床医院妇产科提供, 所有标本使用均获得患者及其家属知情同意。

实验方法:

Western-blot 方法检测 HOXD13 和 FHL1 基因在先天性马蹄内翻足患儿肌肉组织中的表达: 切取约 100 mg 先天性马蹄内翻足患儿肌肉组织和同年龄组正常儿童肌肉组织, 加适量 PBS 匀浆, 弃上清液, 加入 5 倍体积的细胞裂解液, 冰上放置 20 min, 12 000 g 4 °C 离心 1 h, 收集上清液, -70 °C 冻存备用。考马斯亮蓝法定量样品蛋白浓度。

浓度的调整与样品的处理: 把样品制成相同的浓度, 加入样品缓冲液, 沸水煮 5 min。电泳、转膜: 按《分子克隆实验操作指南》进行^[17]。杂交: 取下 PVDF 膜, TBS 浸泡 10 min, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBS 洗 2 次, 5 min/次, 然后加一抗 (Goat 来源 HOXD13 和 FHL1 多克隆抗体, 稀释比例为 1 : 300), 2 h; TBST 洗 2 次, 5 min/次, 加二抗 (1 : 500) 1 h; TBST 洗 2 次, 5 min/次。显色: PVDF 膜用 Western-blue 染液显色后, 观察结果。

应用 P-MATCH 软件预测 FHL1 基因 5' 上游序列转录因子的结合位点: 登陆 www.ensembl.org/ 网址获取 FHL1 基因上游 1 500 bp 序列的信息, 利用 PMATCH 软件预测 FHL1 基因上游序列的转录因子结合位点, 预测到了 SOX, GATA 和 HOX 等转录因子家族的结合位点。其中 HOX 的结合位点主要位于 FHL1 基因上游 550~950 bp 间。

染色质免疫沉淀实验: 染色质免疫实验中以不表达 HOXD13 蛋白质的胚胎脑组织作为阴性对照组织, 以 β -actin 抗体作为非特异性对照抗体, 以位于 FHL1 基因转录起始点上游 5 000~6 000 bp 的一段长 252 bp 的序列作为内对照。实验操作步骤参照试剂盒说明书。

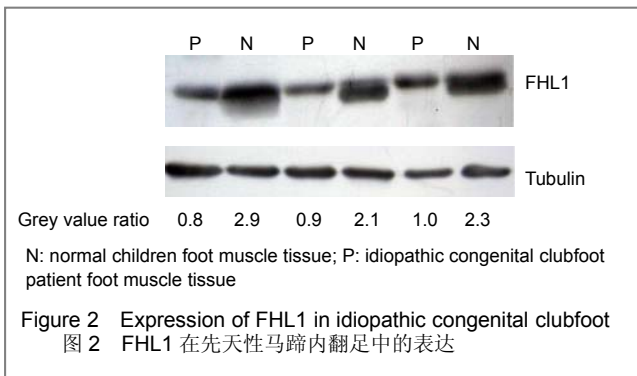
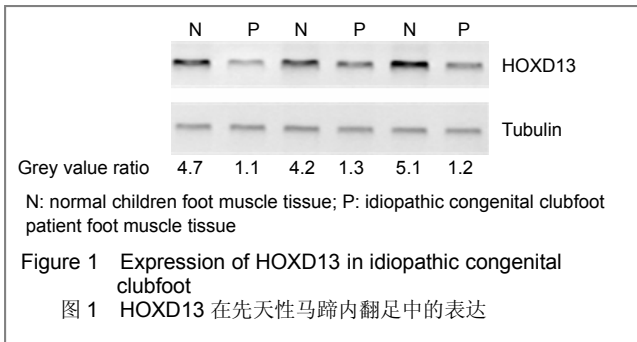
主要观察指标: 肌肉组织 HOXD13, FHL1 蛋白质的表达及人类胚胎肢体发育过程中 HOXD13 直接和 FHL1 基因上游序列结合。

设计、实施、评估者: 实验设计、实施、评估均由本文全体作者完成。

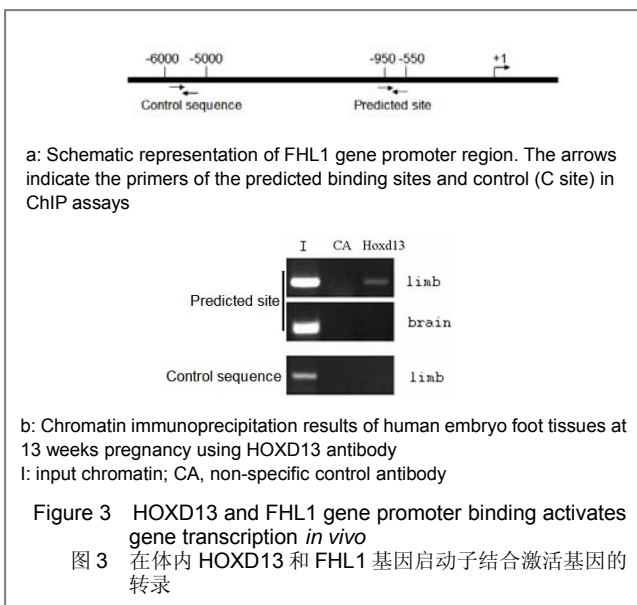
2 结果

2.1 先天性马蹄内翻足患儿肌肉组织 HOXD13, FHL1 蛋白质的表达 与同期正常儿童足部肌肉组织相比, 先天性马蹄内翻足患儿 7 例 FHL1 表达明显下调 (7/15, 47%), 5 例足部

肌肉组织同时存在HOXD13表达明显下调(5/15, 33%), 见图1, 2。



2.2 在人类胚胎肢体发育过程中HOXD13直接和FHL1基因上游序列结合 应用染色质免疫沉淀技术验证在体内HOXD13和FHL1基因上游序列的结合作用。以孕13周人类胚胎足部组织为研究对象进行了染色质免疫沉淀实验, 以不表达HOXD13蛋白的脑组织作为对照[18]。沉淀的足部组织染色质有预测位点的扩增, 无对照位点的扩增, 而在对照脑组织中没有预测位点的扩增, 见图3。



实验结果表明, 在人类胚胎肢体发育过程中HOXD13蛋白可以和FHL1启动子区的预测位点结合发挥其转录调节作用。

3 讨论

先天性马蹄内翻足畸形主要包括足前端内收内旋、足后端内翻、踝关节下垂、胫骨内旋, 估计在出生活婴中的发生率为0.1%, 占足部畸形的85%, 男女之比为(2.0~2.5): 1^[1-2]。临床资料和流行病学研究表明, 遗传因素在先天性马蹄内翻足的发病过程中发挥重要作用, 遗传度为65%, 但其遗传方式和外显率等均不清楚, 故先天性马蹄内翻足致病基因研究进展缓慢^[3-5]。由于目前先天性马蹄内翻足的治疗仍以手术为主, 但很多患者在术后会有畸形的复发, 给患者及其家庭带来沉重的经济负担和精神负担。因此, 研究先天性马蹄内翻足的分子遗传学机制, 将为阐明先天性马蹄内翻足的发生机制和遗传干预提供重要的理论依据。

研究表明, 在先天性马蹄内翻足患者中存在肌肉的发育异常: 肌纤维类型和大小的异常^[19-23]。FHL1基因定位于Xq26, 高水平表达于骨骼肌和心肌组织中, 与肌肉的生长、发育, 分化密切相关。有研究表明, 该基因的异常和人类Scapuloperoneal综合征等神经肌肉疾病有关^[24-26]。本科室前期应用半定量RT-PCR方法检测了先天性马蹄内翻足患者足部肌肉组织的FHL1的表达, 结果表明在马蹄内翻足患者肌肉组织中存在FHL1基因mRNA的表达下调; 为了探讨FHL1的转录调控机制, 利用软件预测了FHL1基因启动子区的转录因子结合位点, 结果在转录起始点上游550~950 bp预测到了HOX的结合位点并利用凝胶阻滞实验在体外初步验证了HOXD13和预测位点的结合作用^[11]。

凝胶阻滞实验是目前研究转录调控蛋白和相应核苷酸序列结合的常用方法, 但是由于许多转录调控蛋白有相似或相同的DNA结合位点, 这种体外分析获取的结果不一定能真实地反映体内转录调控蛋白和DNA结合的状况^[16]。染色质免疫沉淀技术是目前惟一研究体内DNA与蛋白质相互作用的方法。它的基本原理是在活细胞状态下固定蛋白质-DNA复合物, 并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段, 然后通过免疫学方法沉淀此复合体, 特异性地富集目的蛋白结合的DNA片段, 通过对目的片段的纯化与检测, 从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。染色质免疫沉淀分析是基于体内分析发展起来的方法, 它能真实、完整地反映结合在DNA序列上的调控蛋白, 是目前确定与特定蛋白结合的基因组区域或确定与特定基因组区域结合的蛋白质的最好方法。因此本实验进一步应用Western-blot技术检测了先天性马蹄内翻足患儿足部肌肉组织中FHL1, HOXD13基因蛋白质水平的表达情况, 并应用染色质免疫沉淀技术验证了在胚胎足部发育时在体内HOXD13和预测结合位点的结合作用。

本实验中作者发现在 15 例人先天性马蹄内翻足患者肌肉组织中有 7 例存在 FHL1 基因蛋白质水平表达下调, 而这 7 例患者中有 5 例同时存在 HOXD13 基因蛋白质表达下调。这和前期的半定量 RT-PCR 的结果是一致的。作者以孕 13 周人类胚胎足部组织为研究对象进行了染色质免疫沉淀实验, 以不表达 HOXD13 蛋白的脑组织作为对照。沉淀的足部组织染色质有预测位点的扩增, 无对照位点的扩增, 而在对照脑组织中没有预测位点的扩增。实验结果表明, 在人类胚胎肢体发育过程中 HOXD13 蛋白可以和 FHL1 启动子区的预测位点结合发挥其转录调节作用。以上研究结果提示在肢体发育过程中 FHL1 基因的表达受 HOXD13 直接调控。然而, 由于染色质免疫沉淀技术在沉淀之前并没有分离蛋白复合物, 所以并不能排除 HOXD13 是作为蛋白质复合物中的一部分和 FHL1 基因启动子结合的。

综上所述, 作者认为在胚胎下肢肢体发育过程中 FHL1 基因表达通过 HOXD13 直接调控。因此推测在胚胎足部发育时, HOXD13 的表达下调导致 FHL1 的表达水平下调, 进而影响了足部肌肉的生长、发育和分化引起马蹄内翻足畸形的发生。实验结果将为先天性马蹄内翻足的神经肌肉发病学说进一步提供了理论基础。本实验中还有 2 例 FHL1 表达下调的患者未发现 HOXD13 表达水平的改变, 可能是由于 FHL1 的表达还受其他转录因子影响。总之, 肢体发育中存在着错综复杂的转录调控网络, 要明了肢体发育早期涉及哪些转录因子及其具体的调控途径还需要做进一步深入的研究。

4 参考文献

- [1] Miedzybrodzka Z. Congenital talipes equinovarus (clubfoot): a disorder of the foot but not the hand. *J Anat.*2003;202(1):37-42.
- [2] Lochmiller C, Johnston D, Scott A, et al. Genetic Epidemiology study of ICTEV. *Am J Med Genet.*1998;79(2):90-96.
- [3] Rebbeck TR, Dietz FR, Murray JC, et al. A single-gene explanation for the probability of having idiopathic talipes equinovarus. *Am J Hum Genet.*1993;53(5):1051-1063.
- [4] Engesaeter LB. Increasing incidence of clubfoot: changes in the genes or the environment. *Acta Orthop.*2006;77(6):837-848.
- [5] Engell V, Damborg F, Andersen M, et al. Club foot: a twin study. *J Bone Joint Surg Br.*2006;88(3):374-386.
- [6] Cardy AH, Barker S, Chesney D, et al. Pedigree analysis and epidemiological features of idiopathic congenital talipes equinovarus in the United Kingdom: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord.*2007;8:62.
- [7] Wang LL, Jin CL, Liu LY, et al. Analysis of association between 5' HOXD gene and idiopathic congenital talipes equinovarus. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.*2005;22(6):653-656.
- [8] Huber C, Odent S, Rumeur S, et al. Sulphate transporter gene mutations in apparently isolated club foot. *J Med Genet.*2001;38(3):191-193.
- [9] Chapman C, Stott NS, Port RV, et al. Genetics of clubfoot in Maori and Pacific people. *J Med Genet.*2000;37(9):680-683.
- [10] Heck AL, Bray MS, Scott A, et al. Variation in CASP10 gene is associated with idiopathic talipes equinovarus. *J Pediatr Orthop.*2005;25(5):598-602.
- [11] Greene WK, Baker E, Rabbitts TH, et al. Genomic structure, tissue expression and chromosomal location of the LIM-only gene, SLIM1. *Gene.*1999;232(2):203-207.
- [12] Kang MA, Jeoung NH, Kim JY, et al. Up-regulation of skeletal muscle LIM protein 1 gene by 25-hydroxycholesterol may mediate morphological changes of rat aortic smooth muscle cells. *Life Sci.*2007;80(5):460-467.
- [13] Yang J, Moravec CS, Sussman MA, et al. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation.*2000;102(25):3046-3052.
- [14] Loughna PT, Mason P, Bayol S, et al. The LIM-domain protein FHL1 (SLIM 1) exhibits functional regulation in skeletal muscle. *Mol Cell Biol Res Commun.*2000;3(3):136-140.
- [15] Robinson PA, Brown S, McGrath MJ, et al. Skeletal muscle LIM protein 1 regulates integrin-mediated myoblast adhesion, spreading, and migration. *Am J Physiol Cell Physiol.*2003;284(3):681-695.
- [16] Wang LL, Fu WN, Li ZG, et al. Research of HOXD13 and FHL1 in idiopathic congenital talipes equinovarus. *Hereditas.*2008;30(1):46-50.
- [17] (美)萨姆布鲁克等著. 分子克隆实验操作指南(第二版)[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [18] Dollé P, Izpisua-Belmonte JC, Boncinelli E, Duboule D. The Hox-4.8 gene is localized at the 5' extremity of the Hox-4 complex and is expressed in the most posterior parts of the body during development. *Mech Dev.*1991;36(1-2):3-13.
- [19] Gupta P, Singla R, Gupta R, et al. Accessory soleus muscle in clubfoot deformity: a report in four feet. *J Pediatr Orthop B.*2007;16(2):106-109.
- [20] Herceg MB, Weiner DS, Agamanolis DP, et al. Histologic and histochemical analysis of muscle specimens in idiopathic talipes equinovarus. *J Pediatr Orthop.*2006;26(1):91-93.
- [21] Omeroğlu S, Peker T, Omeroğlu H, et al. Intrauterine structure of foot muscles in talipes equinovarus due to high-level myelomeningocele: a light microscopic study in fetal cadavers. *J Pediatr Orthop B.*2004;13(4):263-267.
- [22] Rambani R, Shahid MS. Accessory soleus muscle as a cause of congenital talipes equinovarus. A case report. *Acta Orthop Belg.*2006;72(5):644-646.
- [23] Windisch G, Anderhuber F, Haldi-Brändle V, et al. Additional muscle in idiopathic club foot. *Eur J Pediatr Surg.*2006;16(4):294-296.
- [24] Quinzii CM, Vu TH, Min KC, et al. X-linked dominant scapuloperoneal myopathy is due to mutation in the gene encoding four-and-a-half-LIM protein 1. *Am J Hum Genet.*2008;82(1):208-213.
- [25] Schessl J, Zou Y, McGrath MJ, et al. Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy. *J Clin Invest.*2008;118(3):904-912.
- [26] Windpassinger C, Schoser B, Straub V, et al. An X-linked myopathy with postural muscle atrophy and generalized hypertrophy, termed XMPMA, is caused by mutations in FHL1. *Am J Hum Genet.*2008;82(1):88-99.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家重点基础研究发展规划 (2001CB510301) 项目子课题资助。

利益冲突: 无利益冲突。

文后分析与思考: 先天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, 遗传因素在先天性马蹄内翻足的发生过程中发挥重要作用。FHL1 基因定位于 Xq26, 高水平表达于骨骼肌和心肌组织。先天性马蹄内翻足患者足部肌肉组织中是否存在 FHL1 基因的异常呢? 作者发现在 15 例人先天性马蹄内翻足患者肌肉组织中有 7 例存在 FHL1 基因蛋白质水平表达下调, 而这 7 例患者中有 5 例同时存在 HOXD13 基因的蛋白质表达下调。这与前期半定量 RT-PCR 的结果是一致的。

作者以孕 13 周人胚胎足部组织为研究对象进行了染色质免疫沉淀实验, 实验结果表明, 在人类胚胎肢体发育过程中 HOXD13 蛋白可以和 FHL1 启动子区的预测位点结合发挥其转录调节作用。因此, 推测在胚胎足部发育时, HOXD13 表达下调导致 FHL1 的表达水平下调, 进而影响了足部肌肉的生长、发育和分化, 引起马蹄内翻足畸形的发生。实验结果为先天性马蹄内翻足的神经肌肉发病学说进一步提供了理论基础。