文章编号:1000-5404(2013)11-1043-05

论著

构建FGFR3基因沉默慢病毒载体及其对ATDC5细胞增殖和分化的影响

朱 莹,戚华兵,王 权,王晓凤,黄启钊,陈 林 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,骨代谢修复中心)

[摘要] **目的** 通过构建慢病毒介导的FGFR3RNAi,观察FGFR3对小鼠前软骨细胞系ATDC5增殖和分化的影响。**方法** 针对FGFR3基因的有效靶序构建FGFR3RNAi慢病毒载体,并转染293T细胞进行病毒包装。用包装成功的慢病毒转染ATDC5细胞,Real-time PCR和Western blot检测ATDC5中FGFR3RNAi效率,细胞计数及MTT检测ATDC5的增殖变化,Real-time PCR检测ATDC5中软骨分化相关分子Ⅱ型胶原(collagenⅡ,Col Ⅱ)、X型胶原(collagen X, Col X)和基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达与变化。**结果** FGFR3RNAi慢病毒载体构建成功,并包装出相应的慢病毒,滴度为5×10^8TU/mL。FGFR3RNAi慢病毒转染ATDC5后FGFR3 mRNA水平分别较空白组和阴性对照(NC)组下降了65.2%和68.8%($P<0.01$)。Western blot结果显示,与空白组和NC组相比,FGFR3RNAi组FGFR3蛋白水平显著降低($P<0.01$)。细胞计数及MTT检测结果显示,FGFR3RNAi组细胞增殖能力较空白组和NC组增强($P<0.05$,$P<0.01$)。Real-time PCR结果显示,经向软骨诱导分化后,FGFR3RNAi组细胞中Col Ⅱ、Col X和MMP-13的表达水平较空白组和NC组显著增加($P<0.01$)。**结论** 成功包装的FGFR3RNAi慢病毒能有效降低ATDC5细胞中FGFR3基因的表达。FGFR3表达水平降低后对ATDC5细胞增殖和分化的抑制作用明显减弱。

[关键词] FGFR3;RNAi;慢病毒;ATDC5;增殖;分化
[中图法分类号] R322.71; R394-33; R394.2 [文献标志码] A

Construction of lentivirus vector targeting FGFR3 gene and its effect on proliferation and differentiation in ATDC5 cells

Zhu Ying, Qi Huabing, Wang Quan, Wang Xiaofeng, Huang Qizhao, Chen Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Laboratory of Trauma, Center of Bone Metabolism and Repair, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a lentivirus vector targeting fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene and determine its effect on the proliferation and differentiation of prechondrogenic ATDC5 cells. **Methods** The lentivirus vector targeting FGFR3 gene was constructed and then transfected into 293T cells. The recombinant lentivirus vector was transfected into ATDC5 cells. The expression of FGFR3 was detected by real-time PCR and Western blotting. The effect of FGFR3RNAi vector on the proliferation of ATDC5 cells was measured by cell count assay and MTT assay. The effects of FGFR3RNAi vector on the makers of chondrogenic differentiation, including collagen Ⅱ, collagen X and MMP-13, were detected by real-time PCR. **Results** The recombinant lentivirus vector targeting FGFR3 gene was successfully constructed. The lentivirus titer was 5×10^8TU/mL. Real-time PCR showed that the FGFR3 mRNA level was decreased by 65.2% in FGFR3RNAi transfected cells compared with the cells transfected by the blank vector ($P<0.01$), and lower by 68.8% than the negative control ($P<0.01$). Western blotting indicated that the expression of FGFR3 was also significantly reduced in FGFR3RNAi transfected cells than the blank vector-transfected cells and negative control ($P<0.01$). Cell count assay and MTT assay demonstrated that FGFR3RNAi vector resulted in strongly inhibited proliferation in ATDC5 cells than the blank vector and negative control ($P<0.05$, $P<0.01$). Real-time PCR indicated that FGFR3 induced the mRNA expression of collagen Ⅱ, collagen X and MMP-13 than the other 2 kinds of cells ($P<0.01$). **Conclusion** The recombinant lentivirus vector targeting FGFR3 gene is successfully constructed. It efficiently down-regulates FGFR3 in ATDC5 cells and alleviates the FGFR3-induced inhibi-

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81030036)
[通信作者] 陈 林,电话:(023)68757041,E-mail:linchen70@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130325.0918.012.html(2013-03-25)

tion on the proliferation and differentiation in ATDC5 cells.

[**Key words**] fibroblast growth factor receptor 3; RNAi; lentivirus; ATDC5 cells; proliferation; differentiation

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81030036). Corresponding author: Chen Lin, Tel: 86-23-68757041, E-mail: linchen70@163.com

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptors,FGFRs)是一类跨膜受体,属于酪氨酸激酶受体家族,由FGFR1~4组成,在血管形成、胚胎发育和肿瘤发生等方面发挥重要作用[1-2]。FGFR3是FGFRs家族成员之一,广泛参与骨骼发育尤其是软骨发育过程的调控[3]。FGFR3的功能增强型点突变可引起软骨发育不全(achondroplasia, ACH)、季肋发育不全(hypochondroplasia, HCH)和致死性骨发育不全(thanatophoric dysplasia, TD)等疾病[4]。以往研究表明,FGFR3信号主要通过STAT1和Ihh抑制软骨细胞的增殖[5-6],并通过调控ERK MAP Kinase通路抑制软骨细胞分化[7]。我们的前期研究发现,FGF/FGFR3通路与其他信号通路的交互作用在FGFR3对软骨细胞增殖和分化的影响中发挥重要作用。为进一步明确FGFR3对软骨细胞发育分化的调控作用和机制,我们构建了FGFR3基因的RNAi慢病毒载体,包装相应的慢病毒,并用小鼠前软骨细胞系ATDC5软骨模型[8],观察FGFR3RNAi慢病毒对FGFR3基因表达及对ATDC5细胞增殖、分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

前软骨细胞系ATDC5由美国纽约大学医学中心整形外科刘传聚教授惠赠,慢病毒包装细胞HEK-293T和DH5α大肠杆菌由本实验室保存。DMEM高糖培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清和胰蛋白酶均为HyClone公司产品。慢病毒载体系统含GV248载体、pHelper 1.0载体和pHelper 2.0载体,由上海吉凯基因化学技术有限公司提供,其中GV248载体上含有能够持续表达小RNA的元件,同时也表达绿色荧光蛋白(GFP)。pHelper 1.0载体和pHelper 2.0载体含有慢病毒包装所必需的所有元件。抗FGFR3抗体、HRP标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗购自Santa Cruz公司,β-肌动蛋白抗体、二甲亚砜(DMSO)和噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司,内切酶*Eco*RⅠ、*Age*Ⅰ和T_4 DNA连接酶购自NEB公司,BCA蛋白定量试剂盒、ECL化学发光试剂盒为Pierce公司产品,Trizol购自Invitrogen公司,RNA反转录试剂盒、荧光定量PCR反应试剂盒(SYBRTM Premix *Ex Taq*™ Kit)购自TaKaRa公司。

1.2 慢病毒质粒的构建、转染及包装

根据GV248载体特点,针对FGFR3基因的有效靶序列5′-CCGTGAAGATGCTGAAAGA-3′,设计合成引物针对FGFR3的RNAi序列,FGFR3-1:5′-CCGGAGCCGTGAAGATGCTGAAAGACTCGAGTCTTTCAGCATCTTCACGGCTTTTTTG-3′,FGFR3-2:5′-AATTCAAAAAAGCCGTGAAGATGCTGAAAGACTCGAGTCTTTCAGCATCTTCACGGCT-3′。同时针对小鼠基因组序列,设计合成不含任何同源性的序列作为阴性对照,NC-1:5′-CCGGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCGGAGAATTTTTG-3′;NC-2:5′-AATTCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTCGGAGAA-3′。将合成的寡核苷酸退火形成带黏性末端的双链DNA,与经*Eco*RⅠ和*Age*Ⅰ酶切的GV248载体进行连接,连接产物经转化DH5α大肠杆菌后,挑取转化子行PCR及测序鉴定,阳性克隆标记为GV248-FGFR3RNAi和GV248-NC(negative control)用于后续的转染及病毒的包装。

用GV248-FGFR3RNAi或GV248-NC载体、pHelper 1.0载体和pHelper 2.0载体共转染293T细胞,病毒质粒的转染流程参见Lipofectamine 2000说明书。转染8 h后,弃去培养基,以20 mL的PBS液洗涤细胞1次,再加入完全培养基25 mL,继续培养48 h。

1.3 慢病毒的收集和浓缩

收集转染后48 h的293T细胞上清液。于4 ℃,5 000×*g*离心15 min,保留上清,以除去细胞碎片。然后用0.45 μm的滤器过滤上清液于超速离心管中,即为病毒粗提液。将病毒粗提液加入到过滤杯中,盖上盖子,并将过滤杯置于滤过液收集管中。5 000×*g*离心约15 min,至需要的病毒浓缩体积。离心结束后,取出离心装置,将过滤杯和滤过液收集杯分开,然后将过滤杯倒扣在样品收集杯上,离心力小于1 000×*g*,离心2 min。样品收集杯中的液体即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液分装后保存在病毒专用管中,放于-80 ℃可长期保存。取出其中1支进行病毒生物学滴度测定。

1.4 慢病毒的滴度测定

测定前1 d,取对数生长期的293T细胞接种于96孔板中,每孔为4×10^4个细胞,体积100 μL。根据预期的病毒滴度,准备8~10个灭菌EP管。在每个EP管中加入90 μL的无血清培养基。取病毒原液10 μL加入到第1个EP管中,充分混匀后,再取10 μL加入到第2个EP管中。继续相同的操作至最后1管。选定转染的细胞孔,吸弃90 μL培养基,并加入90 μL已经稀释好的病毒溶液,放入培养箱中继续培养。24 h后,每孔加入完全培养基100 μL。4 d后,观察细胞中荧光表达情况,并进行滴度测定。

1.5 细胞培养及药物浓度筛选

ATDC5细胞培养于含5%胎牛血清的DMEM/F12培养基,按4×10^5个/孔接种至12孔培养板,每孔按1 μg/mL的浓度递增加入嘌呤霉素,范围为0~10 μg/mL,以5 d末正好全部杀死细胞的药物浓度为筛选的最适浓度,本实验筛选出的最适浓度为4 μg/mL。

1.6 病毒转染ATDC5细胞

取对数生长期的ATDC5细胞接种于12孔板中,待细胞生长融合度约为70%时进行转染。分为空白组、阴性对照(NC)

组和 FGFR3RNAi 组。转染条件为:DMEM/F12 完全培养基,8 μg/mL Polybrene,感染复数(MOI)值为 20,转染 12 h 后弃去培养基,PBS 清洗 2 次,加入 1 mL 完全培养基,48 h 后更换为含有 4 μg/mL 嘌呤霉素的 DMEM/F12 完全培养基,嘌呤霉素筛选培养 3 周后更换为 DMEM/F12 完全培养基。

1.7 Real-time PCR 检测慢病毒对 ATDC5 细胞内源性 FGFR3 的干扰作用

嘌呤霉素筛选后的 ATDC5 细胞以 4×10^5/mL 接种于 12 孔板中,待细胞融合度至 90% 后收集细胞抽提总 RNA,行 Real-time PCR 检测 FGFR3 基因的表达,同时以 Cyclophilin-A 作为内参。扩增引物序列如下[9]:FGFR3 上游:5′-TGGTCCAGAGCAGCGAGTTGT-3′;FGFR3 下游:5′-CTTCGTGGGAGGCATTTAGCA-3′;Cyclophilin-A 上游:5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3′;Cyclophilin-A 下游:5′-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3′。

1.8 Western blot 检测 ATDC5 细胞中 FGFR3 的表达

嘌呤霉素筛选后的 ATDC5 细胞以 4×10^5/mL 接种于 12 孔板中,待细胞融合度至 90% 后收集细胞提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,免疫印迹法检测 FGFR3 的表达。

1.9 Real-time PCR 检测Ⅱ型胶原(collagenⅡ,Col Ⅱ)、Ⅹ型胶原(collagen Ⅹ, Col Ⅹ)和基质金属蛋白酶-13(MMP-13)的表达

空白组、NC 组和 FGFR3RNAi 组的 ATDC5 细胞以 4×10^5/mL 接种于 12 孔板中,待细胞融合度为 90% 以上后,无血清 DMEM/F12 培养基饥饿过夜,然后更换为含 ITS 诱导剂的完全 DMEM/F12 培养基开始诱导分化。诱导开始记为 0 d,共诱导培养 7 d。分别收集 3 组诱导 0 d 和 7 d 的 ATDC5 细胞,收集细胞抽提总 RNA,进行 Real-time PCR 检测 Col Ⅱ、Col Ⅹ和 MMP-13 的表达。扩增引物如下[9]:Col Ⅱ上游:5′-CTGGTGGAGCAGCAAGAGCAA-3′;Col Ⅱ下游:5′-CAGTGGACAGTAGACGGAGGA AAG-3′;Col Ⅹ上游:5′-GCAGCATTACGACCCAAGAT-3′;Col Ⅹ下游:5′-CATGATTGCACTCCCTGAAG-3′;MMP-13 上游:5′-CAGTTGACAGGCTCCGAGAA-3′;MMP-13 下游:5′-CGTGTGCCAGAAGACCAGAA-3′。

1.10 MTT 检测 ATDC5 细胞的增殖能力

取对数生长期的空白组、NC 组和 FGFR3RNAi 组的 ATDC5 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中,接种当天记为 1 d。每天更换完全培养基,培养至第 4 天,每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL),培养箱内孵育 4 h,吸尽培养基,每孔加入 150 μL DMSO,置于摇床上低速振荡 10 min,待结晶溶解物充分溶解。在酶标仪的波长 490 nm 处测量各孔的光密度值[D(490)]。

1.11 ATDC5 细胞生长曲线

取对数生长期的空白组、NC 组和 FGFR3RNAi 组的 ATDC5 细胞以 2×10^4/孔接种于 24 孔板中,接种当天记为 1 d,以后每 2 天进行 1 次细胞计数,绘制不同组 ATDC5 细胞生长曲线。

1.12 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建及滴度的测定

将挑选的阳性克隆经 PCR 与测序鉴定,GV248-FGFR3RNAi 及 GV248-NC 载体构建正确。

将浓缩后的病毒采用孔稀释法进行滴度测定,FGFR3RNAi 慢病毒、NC 慢病毒的滴度分别为 5×10^8、1×10^9TU/mL。

2.2 慢病毒转染 ATDC5 细胞

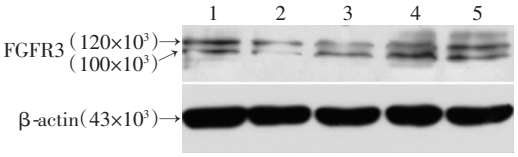
分别用 FGFR3RNAi、NC 慢病毒转染 ATDC5 细胞,72 h 后在荧光显微镜下观察,当 MOI 值为 20 时,转染效率较高,细胞状态好。

2.3 Real-time PCR 检测 FGFR3RNAi 慢病毒的干扰效率

FGFR3RNAi 慢病毒载体对 ATDC5 内源性的 FGFR3 具有干扰作用。与空白组(1.00 ± 0.06)和 NC 组(1.12 ± 0.09)相比,FGFR3RNAi 组的 FGFR3 mRNA 水平(0.35 ± 0.04)分别下降了 65.2% 和 68.8%($P<0.01$)。

2.4 Western blot 检测 FGFR3RNAi 慢病毒对 FGFR3 的干扰作用

FGFR3RNAi 组的 FGFR3 蛋白水平较空白组和 NC 组明显降低($P<0.01$),空白组和 NC 组 FGFR3 蛋白水平无明显差异($P>0.05$,图 1)。

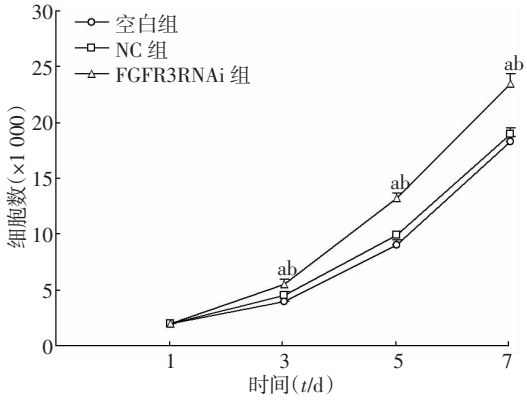


1:空白组;2~3:FGFR3RNAi 组;4~5:NC 组

图 1 Western blot 检测 FGFR3RNAi 慢病毒对 FGFR3 蛋白水平的影响

2.5 细胞计数及 MTT 检测 ATDC5 细胞增殖能力

细胞计数结果表明,培养 3、5、7 d 的 FGFR3RNAi 组细胞较空白组和 NC 组增殖加快($P<0.05$)。见图 2。MTT 检测培养第 4 天的 ATDC5 细胞,结果显示,FGFR3 基因沉默后 ATDC5 细胞数量增加[空白组(0.575 ± 0.014)、NC 组(0.571 ± 0.013)、FGFR3RNAi 组(0.750 ± 0.015),$P<0.01$]。

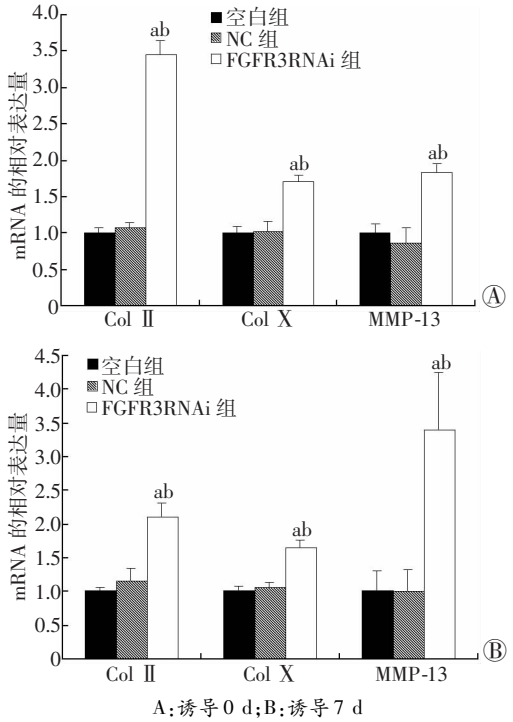


a:$P<0.05$,与空白组比较;b:$P<0.05$,与 NC 组比较

图 2 培养不同时间各组 ATDC5 细胞增殖能力的变化

2.6 FGFR3 对 ATDC5 细胞分化的影响

Real-time PCR 检测结果显示,ITS 诱导 0 d 和 7 d 的 ATDC5 细胞中,FGFR3RNAi 组 Col Ⅱ、Col Ⅹ和 MMP-13 基因表达高于空白组和 NC 组($P<0.01$),空白组与 NC 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。



A:诱导0 d;B:诱导7 d

a: $P<0.01$,与空白组比较;b: $P<0.01$,与NC组比较

图3 Real-time PCR检测经ITS诱导不同时间各组ATDC5细胞中Col Ⅱ、Col X和MMP-13 mRNA的表达

3 讨论

FGFR3是酪氨酸激酶家族成员之一,与其相应配体成纤维生长因子(fibroblast growth factor,FGF)结合后,通过下游STAT1、PI-3K、MAPK等通路调节细胞的增殖与分化,广泛参与机体多种重要的生命活动。

骨骼发育主要有软骨内成骨和膜内成骨两种方式,其中四肢骨和椎骨的发育主要是通过软骨内成骨过程完成的[10-11]。生长板软骨细胞的增殖与分化对长骨的纵向生长、骨骼发育十分重要。FGF/FGFR3通路在这一过程中发挥重要作用[12]。Deng等[13]、Colvin等[14]研究表明FGFR3基因敲除小鼠骨骼过度生长、生长板增生和肥大软骨细胞带增宽;Chen等[15]也发现模拟人ACH的$FGFR3^{G369C/+}$功能增强型点突变小鼠个体明显减小,长骨生长板软骨细胞短稀、增殖能力减弱,提示FGFR3抑制软骨形成,并且主要是通过影响软骨细胞的增殖和分化来实现,表明FGFR3是骨骼发育的负性调节分子[16]。

软骨发育是一个多分子、多信号通路共同参与调控的过程。以往研究表明,FGF/FGFR3信号通路在这一过程中的不同阶段,与多个信号通路存在交互作用,如与软骨发育密切相关的BMP信号[17],此外也参与调控了PI3K/AKT[18]、Wnt[19]等通路。Xie等[20]发现外源性甲状旁腺素(1-34)能够缓解TD小鼠的致死性侏儒表型,但具体的分子机制还不明确。虽然现在已经有FGFR3基因敲除小鼠模型[13-14],也能够获取FGFR3敲除小鼠的原代软骨细胞,但其细胞数量少,分离难度大,不便于对细胞内的分子及信号通路进行相关研究。

慢病毒载体是一种以人类免疫缺陷病毒-1为基础的病毒载体,它能够将外源基因有效地整合到靶细胞的基因组中进行稳定表达,并且不易诱发宿主细胞免疫反应,安全性好,对分裂期细胞与非分裂期细胞均有较高的转染效率[21]。近年来已经被广泛地应用于基因过表达和基因沉默的相关研究。

在本研究中,我们利用FGFR3RNAi慢病毒转染ATDC5细胞,成功建立了FGFR3RNAi慢病毒载体,并构建了FGFR3基因沉默的稳定ATDC5细胞系,结果表明FGFR3抑制ATDC5细胞的增殖和分化。此外,由于ATDC5细胞是目前公认的研究软骨内成骨过程中软骨细胞增殖、分化各阶段的良好模型,通过FGFR3RNAi慢病毒转染后得到的FGFR3表达水平降低的ATDC5稳定细胞系将为进一步研究FGF/FGFR3信号通路在软骨发育各个阶段与其他信号通路的交互作用提供实验依据。

参考文献:

[1] Kumar S B, Narasu L, Gundla R, *et al*. Fibroblast growth factor receptor inhibitors[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(4): 687-701.

[2] Coutu D L, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging[J]. Aging (Albany NY), 2011, 3(10): 920-933.

[3] Marie P J. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update[J]. Gene, 2012, 498(1): 1-4.

[4] Foldynova-Trantirkova S, Wilcox W R, Krejci P. Sixteen years and counting: the current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in skeletal dysplasias[J]. Hum Mutat, 2012, 33(1): 29-41.

[5] Sahni M, Ambrosetti D C, Mansukhani A, *et al*. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway[J]. Genes Dev, 1999, 13(11): 1361-1366.

[6] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon A P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation[J]. Genes Dev, 1999, 13(16): 2072-2086.

[7] Murakami S, Balmes G, McKinney S, *et al*. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype[J]. Genes Dev, 2004, 18(3): 290-305.

[8] Yao Y, Wang Y. ATDC5: An excellent *in vitro* model cell line for skeletal development[J]. J Cell Biochem, 2012, [Epub ahead of print].

[9] 金旻, 谢杨丽, 黄炜, 等. 原代培养小鼠关节软骨细胞的分化与诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(41):8104-8108.

[10] Kronenberg H M. Developmental regulation of the growth plate[J]. Nature, 2003, 423(6937): 332-336.

[11] Karsenty G, Kronenberg H M, Settembre C. Genetic control of bone formation[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009, 25: 629-648.

[12] Du X, Xie Y, Xian C J, *et al*. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(12): 3731-3743.
[13] Deng, C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth[J]. Cell, 1996, 84(6): 911-921.
[14] Colvin J S, Bohne B A, Harding G W, *et al*. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3[J]. Nat Genet, 1996, 12(4): 390-397.
[15] Chen L, Adar R, Yang X, *et al*. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis[J]. J Clin Invest, 1999, 104(11): 1517-1525.
[16] Su N, Du X, Chen L. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases[J]. Front Biosci, 2008, 13: 2842-2865.
[17] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584.
[18] Priore R, Dailey L, Basilico C. Downregulation of Akt activity contributes to the growth arrest induced by FGF in chondrocytes[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(3): 800-808.
[19] ten-Berge D, Brugmann S A, Helms J A, *et al*. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development[J]. Development, 2008, 135(19): 3247-3257.
[20] Xie Y, Su N, Jin M, *et al*. Intermittent PTH (1-34) injection rescues the retarded skeletal development and postnatal lethality of mice mimicking human achondroplasia and thanatophoric dysplasia[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(18): 3941-3955.
[21] 冯正平, 邓华聪, 姜蓉, 等. p38MAPK基因RNAi慢病毒载体的构建及在MC3T3-E1细胞的表达[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(15): 1598-1601.

(**收稿**:2013-01-29;**修回**:2013-03-15)
(编辑 汪勤俭)

(上接1042页)

2.3 本地NT正常中位数计算NT≥1.5MoM及NT<1.5MoM检出的胎儿染色体异常数比较

本地NT正常中位数计算出NT=1.5MoM时在孕11、12、13周分别为2.3、2.4、2.7 mm。在NT≥1.5MoM的胎儿中,接受胎儿染色体检查、胎儿超声检查,诊断胎儿染色体异常或可疑胎儿染色体异常病例共27例。NT<1.5MoM病例中,检出的胎儿染色体异常2例(47,XXX和46,X,+Mark)。

2.4 在NT≥1.5MoM、2.0MoM、3.0MoM中检出DS、ES胎儿例数

本地NT正常中位数计算NT MoM与Lifecycle软件内嵌正常中位数值计算NT MoM,2组在NT≥1.5MoM、2.0MoM、3.0MoM中分别确诊5、4、2例DS胎儿,例数相同。用NT≥1.5MoM作为切割值,检出所有的DS、ES,而用NT≥2.0MoM作为切割值,漏诊2例DS,用NT≥3.0MoM作为切割值,漏诊3例DS,1例ES。

3 讨论

妊娠14周前胎儿淋巴系统未发育健全,少部分淋巴液聚集在颈部淋巴囊或淋巴管内形成NT,14周后淋巴系统发育完善,积聚的淋巴液迅速引流到颈内静脉,NT随之消失。NT随孕周呈轻度增加趋势[2-3]。本研究统计了云南地区早孕期胎儿NT正常中位数值,11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数值分别为1.5、1.6、1.8 mm。文献[4]报道香港胎儿NT与胎儿头臀长相关,头臀长62.3 mm(12周)时NT正常中位数值为1.6 mm,与本研究结果一致;比较Lifecycle软件内嵌NT正常中位数值,云南地区11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数值稍高,而文献[5]报道的数据较之稍低;英国胎儿医学基金会报道胎儿头臀长45 mm时NT中位数为1.2 mm,84 mm时为1.9 mm[6]。NT正常中位数值是否存在地区差异,以及将云南地区11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数用于校正Lifecycle软件内嵌NT正常中位数后,能否提高早孕期产前筛查的检出率,还需要进一步增加样本数证实。

英国胎儿医学基金会将NT增厚定义为NT大于正常值第95百分位数[3],因国内无11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数值,故通常不考虑孕周的影响,将NT≥3 mm作为超过正常范围的标准,这可能导致在孕11周时低估了胎儿风险。本研究将所建立的云南地区11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数用于计算NT MoM,在NT=1.5MoM时,约等于NT的第95百分位数值,在孕11、12、13周时分别为2.3、2.4、2.7 mm。本研究确诊DS胎儿NT均≥1.5MoM,云南地区11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数值与Lifecycle软件内嵌NT正常中位数值计算的NT MoM比较,2组NT≥1.5MoM病例中检出的DS胎儿例数相同,以NT≥1.5MoM为切割值,检出所有的DS、ES,无漏诊病例,而以2.0MoM、3.0MoM为切割值则分别漏诊了2、3例DS胎儿。因此,建立云南地区11~13^{+6}周胎儿NT正常中位数值具有重要的临床意义。超声医师将11、12、13周胎儿NT≥2.3、2.4、2.7 mm作为NT超过正常范围的切割值,建议该孕妇接受早孕期一站式风险评估、胎儿超声心动图检查、遗传咨询、高风险接受产前诊断,是一个简便、可靠的临床评估方法。

参考文献:

[1] Nicolaidis K H, Azar G, Byrne D, *et al*. Fetal nuchal traslucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy[J]. BMJ, 1992, 304(6831): 867-869.
[2] 陈姝,马永红, 章锦曼, 等. 胎儿颈后透明层截断值的超声测量分析[J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(2):68-73.
[3] 章锦曼, 黄燕玲, 朱宝生, 等. 昆明地区11~13^{+6}周胎儿头臀长与颈项透明层厚度等的相关性分析[J]. 云南医药, 2009, 30(6): 624-625.
[4] Sahota D S, Leung T Y, Chen M, *et al*. Comparison of likelihood ratios of first-trimester nuchal translucency measurements: multiples of median, delta or mixture[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2010, 36(1): 15-19.
[5] 蒋涛,孙云,张晓娟,等. 南京地区孕早期产前筛查指标中位数建立和临床意义探讨[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2011, 31(1):71-75.
[6] Nicolaidis K H. 孕11至13^{+6}周超声扫查[M]. 梁德杨,刘子建,译. 伦敦:英国伦敦胎儿医学基金会, 2004: 17.

(**收稿**:2013-03-10;**修回**:2013-03-25)
(编辑 郭建秀)