骨科学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000743

骨发育相关基因在 SEDT 中差异表达的研究

胡玉娟，熊　丰，朱高慧，罗　庆，朱　岷

（重庆医科大学附属儿童医院内分泌科；儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室；儿科学重庆市重点实验室；重庆市（儿童发育重大疾病诊治与预防）国际科技合作基地，重庆　400014）

【摘　要】目的：分别靶向增强和干扰人软骨细胞（human chondrocytes-articular，HC-a）X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良（X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda，SEDL）基因，骨再生 PCR 芯片检测细胞内骨发育相关基因表达变化，观察干扰后基因表达谱的变化。**方法**：分别转入前期构建的靶向增强 SEDL 的腺病毒质粒 pAd5-SEDL 和靶向干扰 SEDL 的慢病毒质粒 LV-siSEDL 到 293T 细胞包装成重组腺病毒 pAd5-SEDL 和重组慢病毒 LV-siSEDL，扩增重组腺病毒，收集病毒液，检测病毒滴度。将重组腺病毒、重组慢病毒以最适感染复数（multiplicity of infection，MOI）分别感染 HC-a，实验分 4 组：增强组（HC-a/pAd5-SEDL，重组腺病毒 pAd5-SEDL 感染 HC-a 增强 SEDL 基因表达）、增强阴性对照组（HC-a/空载体（pAd5），空白腺病毒 pAd5 感染 HC-a 作阴性对照）、干扰组（HC-a/LV-siSEDL，重组慢病毒 LV-siSEDL 感染 HC-a 干扰 SEDL 基因表达）、干扰阴性对照组（HC-a/空载体（LV），空白慢病毒 LV 感染 HC-a 作阴性对照），通过 QPCR 检测 HC-a 中 SEDL 基因表达、Western blot 检测 HC-a 中 sedlin 蛋白表达，验证是否成功干扰或增强 SEDL 基因表达，收集 4 组细胞 mRNA 进行骨再生 PCR 芯片（含 84 个基因）检测。**结果**：（1）收获高滴度重组腺病毒 pAd5-SEDL，病毒滴度为 2.6×10^{11} pfu/ml。并使重组腺病毒 pAd5-SEDL 和重组慢病毒 LV-siSEDL 成功感染 HC-a。（2）HC-a SEDL 基因表达量中增强组（2.14 ± 0.36）较增强阴性对照组（1.21 ± 0.25）增高（P=0.022），干扰组（0.86 ± 0.11）较干扰阴性对照组（1.34 ± 0.06）降低（P=0.003）；sedlin 蛋白表达量中，增强组（0.56 ± 0.04）较增强阴性对照组（0.37 ± 0.05）增高（P=0.006），干扰组（0.13 ± 0.02）较干扰阴性对照组（0.36 ± 0.04）降低（P=0.001）。（3）基因芯片结果：HC-a 内 SEDL 基因干扰后，芯片结果显示：基因上调 21 个，下调 5 个。HC-a 内 SEDL 基因增强后，骨再生 PCR 芯片结果显示：基因上调 27 个，下调 12 个。干扰组的差异表达基因中，在增强组中呈反向变化，且与软骨发育相关的基因有 5 个：COL2A、BMP3、FLT1、GDF10、IGF1。**结论**：通过增强及沉默软骨细胞内 SEDL 基因，发现骨发育相关基因中 COL2A、BMP3、FLT1、GDF10、IGF1 出现差异表达，可能与 SEDL 基因有关联。

【关键词】X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良；基因芯片；基因重组病毒

【中图分类号】R725.8　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2014-12-06

Differential expression of bone development-related gene in SEDT

Hu Yujuan, Xiong Feng, Zhu Gaohui, Luo Qing, Zhu Min

(*Department of Endocrinology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Co-operation Center for Child Development and Disorders*)

【Abstract】***Objective***: To detect the varied expressions of bone development-related genes by PCR microarray in enhanced and interfered human chondrocytes-articular (HC-a) X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDL) gene expression groups, respectively. ***Methods***: The vectors which targeting enhanced SEDL adenovirus vector pAd5-SEDL and interfered SEDL lentivirus plasmid LV-siSEDL were constructed previously. 293T cells were transformed with pAd5-SEDL and LV-siSEDL respectively, and packaged recombinant adenovirus pAd5 -SEDL and lentivirus LV-siSEDL were amplified by HEK293 cells. The virus was collected and the virus titers were detected. The recombinant adenovirus and lentivirus infected HC-a on optimal multiplicity of infection (MOI); the experiment was divided into four groups: enhanced group (HC-a/pAd5-SEDL, pAd5-SEDL infected HC-a), reinforced the negative control group (HC-a/empty vector (pAd5), pAd5 infected HC-a), interference group (HC-a/LV-siSEDL, LV-siSEDL infected HC-a), interference group negative con-

作者介绍：胡玉娟，Email：hyj372@163.com，研究方向：小儿内分泌。

通信作者：熊　丰，Email：xiongfw2013@163.com。

基金项目：重庆市自然科学基金计划重点资助项目（编号：CSTS，2007BA5028）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1603.024.html（2015-08-05）

trol group(HC-a/empty vector(LV),LV infected HC-a). SEDL gene expression was detected by qPCR;sedlin protein was detected by Western blot to verify whether the SEDL gene expression was interfered or enhanced successfully. Then cellular mRNA of four groups was collected and detected osteogenesis PCR array. ***Results***:①High titer recombinant adenovirus pAd5-SEDL was harvested and the viral titer was 2.6×10^{11} pfu/ml. Both of recombinant adenovirus pAd5-SEDL and lentivirus LV-siSEDL infected HC-a successfully. ②SEDL gene expression was higher in enhanced group(2.14 ± 0.36) than in negative control group(1.21 ± 0.25)(P=0.022);SEDL gene expression was lower in interference group(0.86 ± 0.11) than in interference group negative control group(1.34 ± 0.06)(P=0.003). Sedlin protein expression was increased in enhanced group(0.56 ± 0.04) than in negative control group(0.37 ± 0.05)(P=0.006);Sedlin protein expression was lower in interference group(0.13 ± 0.02) than in negative control group(0.36 ± 0.04)(P=0.001). ③Microarray results:after HC-a disturbance within the SEDL,gene chip results showed that 21 genes were up-regulated,5 genes were down-regulated. After the HC-a within SEDL gene enhanced osteogenesis,PCR array results showed that 27 genes were up-regulated,while 12 genes were down-regulation. The varied expression in interference showed a reverse change in enhanced group. There were five developmental genes associated with cartilage:COL2A,BMP3,FLT1,GDF10,IGF1. ***Conclusion***:By enhancing or silencing the SEDL gene of chondrocytes,we find some bone growth-related genes,eg. COL2A,BMP3,FLT1,GDF10,IGF1 express differentially,which may be associated with SEDL gene.

【Key words】X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda(SEDL);microarray;recombinant virus

骨骼疾病是一类严重危害人类健康的疾病，许多骨病是由于遗传因素所致。遗传性骨病可自胎儿期骨发育开始，出生后表现为多发性骨骼畸形，严重影响患者的生存质量。X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良(X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda，SEDT)是一种遗传性软骨发育不良疾病，遗传方式为 X 连锁隐性遗传，主要病理改变为软骨内骨生成障碍，导致脊柱骨骺发育异常和关节软骨退行性变。临床特点表现为短躯干型矮小，椎体畸形，早发的大关节骨关节炎，成年后全身骨骼发生退行性变、大关节破坏，出现骨痛、行走障碍，致残[1]。至今尚无有效治疗方法。

目前已知 SEDT 的发病与致病基因 SEDL 相关，SEDL 基因突变导致其功能产物 sedlin 蛋白失活，进而引起脊柱及骨关节的发育障碍[1]，但 SEDT 的发病机制及 sedlin 蛋白的功能尚不明确。目前对 SEDT 的研究主要集中于不同患病家系中 SEDL 基因突变类型，国内外已经发现 40 余种 SEDL 基因不同的突变类型[2]，但对 SEDL 基因突变及 sedlin 蛋白功能缺陷如何引起 SEDT 的发病机制的研究进展甚少。已发现的 sedlin 功能局限在 sedlin 可能参与形成囊泡和细胞内蛋白质从内质网到高尔基体之间的运输过程。最新研究显示，内质网中新合成的蛋白质在以囊泡运输的形式出膜时需要 sedlin 协助[3]。Sedlin 蛋白功能障碍导致细胞内蛋白组学发生改变，而 SEDL 基因突变后细胞内基因组学的变化目前尚未见报道。

SEDL 基因是一种与骨骼生长发育相关的基因，在人体组织中广泛分布，其产物 sedlin 蛋白在骨组织中的表达量高[4]。临床观察发现，SEDT 患者病变主要集中在脊柱及骨关节等骨骼系统，而其他系统基本不受累[1]。因此猜测 SEDL 基因及其功能蛋白在骨骼的生长发育中是必须的，不可替代。骨发育受多种因素调节，其中基因调节在骨发育中起重要作用。骨骼的生长发育是数十个甚至数百个基因表达在时间和空间发生改变的结果。骨骼疾病通常由多基因改变引起，也可通过调节关键基因的表达，间接调控并引发一系列不同的下游基因表达变化，从而造成骨骼组织生长发育异常。SEDL 基因突变后引起哪些骨发育相关基因表达变化？目前尚不清楚。找到这些骨发育的差异表达基因将为探索 SEDL 基因在骨病中的发病分子机制及 sedlin 蛋白在软骨内成骨过程中的作用提供重要基础。

基因芯片具有信息量大、可信度高、操作简单、重复性好等卓越性能。本研究构建重组腺病毒 pAd5-SEDL 和重组慢病毒 LV-siSEDL，靶向增强及沉默软骨细胞 SEDL 基因表达，通过骨再生 PCR 芯片观察骨发育相关基因表达变化，为进一步研究 SEDL基因在骨病中的发病分子机制及 sedlin 蛋白在软骨内成骨过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组腺病毒 pAd5-SEDL 和重组慢病毒 LV-siSEDL 是

课题组前期构建。人软骨细胞(human chondrocytes-articular, HC-a)(购于美国 ScienCell 公司),HEK293(由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室惠赠)。骨再生 PCR 芯片(Osteogenesis PCR Array),货号 PAHS-026A(人),购自上海康成生物工程有限公司。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,RNA 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,sedlin 抗体来自 Epitomics 公司,β-actin 单克隆抗体购自联科生物有限公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗鼠 IgG 抗体及山羊抗兔 IgG 抗体购自中杉金桥公司。Laemmli 样品缓冲液(1x)配方:Tris 碱 1.51 g,SDS 4 g,β-巯基乙醇 10 ml,甘油 20 ml,2 mg 溴酚蓝,dH_2O 200 ml。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建、腺病毒载体及慢病毒载体的包装 重组腺病毒 pAd5-SEDL 和重组慢病毒 LV-siSEDL 是课题组前期构建。

1.2.2 慢病毒包装、腺病毒扩增及病毒滴度测定 磷酸钙-DNA 共沉淀法将慢病毒包装混合物与重组慢病毒载体导入 293T 细胞包装后收集病毒上清。

培养 293 细胞,生长融合度达 75%时,半量更换 DMEM 培养基(不含血清),加入待扩增的腺病毒,细胞放 37 ℃、5% CO_2 培养箱继续培养。4~6 h 后更换含血清的新鲜培养基,观察红色荧光蛋白表达量及表达强度,当 CPE(细胞变圆、成团、漂浮)达 90%时收集 293 细胞,反复冻融 4 次,低温高速离心收集腺病毒上清液。

24孔板接种 293 细胞,当细胞处于对数生长期,病毒原液用 0.4 ml 培养基(不含 FBS)按不同比例稀释逐级梯度稀释,分别加入 24 孔板细胞,培养 24 h 后荧光显微镜下计数红色荧光蛋白(red fluorescence protein,RFP)表达细胞数,根据公式计算病毒滴度:病毒滴度(pfu/ml)=[RFP 阳性细胞数 × 病毒液稀释倍数(pfu/ml)/0.4 ml。

1.2.3 细胞培养及感染 HC-a 培养于含 10%胎牛血清的软骨细胞培养基中,置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中无菌培养。感染将细胞均匀接种于 6 孔板,每孔接种 1×10^5 个细胞,培养至细胞融合度达 75%时,加入含 6 μg/ml 聚凝胺和细胞培养基稀释到相应滴度的病毒液进行感染,4~6 h 后更换含血清的新鲜培养基,感染 48 h 后提取细胞 mRNA 及全蛋白分别进行 real-time PCR 和 Western blot 检测。

1.2.4 Real-time PCR 检测 SEDL mRNA 水平 重组腺病毒、空白腺病毒和重组慢病毒、空白慢病毒感染人软骨细胞 72 h 后收集细胞,采用 TRIzol 法提取 4 组细胞总 RNA,并检验其浓度、纯度和完整性。逆转录反应体系参考 TaKaRa 公司说明进行,qPCR 条件:95 ℃ 15 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 15 s。共计 40个循环。SEDL 上游引物 5'-GGAAGGCAGAATCCAAAG-ACG-3'。下游引物 5'-CCACTCGTTGAACTTGTCCAC-3',β-actin 上游引物 5'-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAGA-CC-3',下游引物 5'-GCCAGGTCCAGACGCAGGAT-3'。所有实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 Western blot 检测转染后各组细胞 sedlin 蛋白水平变化 使用 Laemmli 样品缓冲液(1 ×)提取各组人软骨细胞总蛋白,取 50 μg/孔蛋白上样,12%SDS-PAGE 凝胶电泳后,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉的 Tris 盐吐温缓冲液(Tris bufered saline,0.05%Tween-20,TBST)室温下摇床上封闭 2 h,加入一抗(sedlin 抗体 1:200;β-actin 抗体 1:2 000)4 ℃过夜孵育,TBST 洗膜后二抗室温孵育 2 h(HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体及山羊抗兔 IgG 抗体 1:2 000 稀释),洗膜后加入化学发光试剂进行放射自显影,成像,拍照并记录。采用 Quantity One 软件分析图像,目的蛋白条带的灰度值与内参 β-actin 蛋白的灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平,并统计分析。

1.2.6 骨再生 PCR 芯片检测各组细胞骨发育相关基因表达变化 骨再生 PCR 芯片含 84 个基因表达谱。包括骨骼系统发育和骨矿物质代谢相关的功能基因,也包括生长因子和介导骨发生的基因以及与细胞生长、增殖和分化相关基因,还包括参与骨发育的细胞外基质分子和细胞黏附分子基因。

采用骨再生 PCR 芯片筛选差异表达基因:分辨率为 5 um 的 Agilent 扫描仪自动以 100%和 10%光电倍增管(PMT)各扫描芯片 1 次,并将 2 次结果自动合并。芯片原始数据扣除本底并归一化处理,排除不表达基因后,根据差异倍数(fold change)筛选差异表达基因,以 $P<0.01$ 或 fold change>2 或<0.5 判断为差异表达基因。

1.3 统计学分析

基因芯片以外的数据使用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验进行数据分析,检验水准 $\alpha=0.05$。基因芯片数据采用 ΔΔCt 方法分析,检测各样本反应管 Ct 值,计算 $2^{-\Delta\Delta Q}$(各样本 ΔCt=目的基因 Ct-内参基因 Ct,ΔΔCt=处理组 △Ct-对照组 △Ct),当目的基因与内参基因的扩增效率接近时,$2^{-\Delta\Delta Q}$ 表示目的基因在处理组样本中相对于对照组样本的表达倍数,表达倍数>2 或<0.5 判断为差异表达基因。

2 结 果

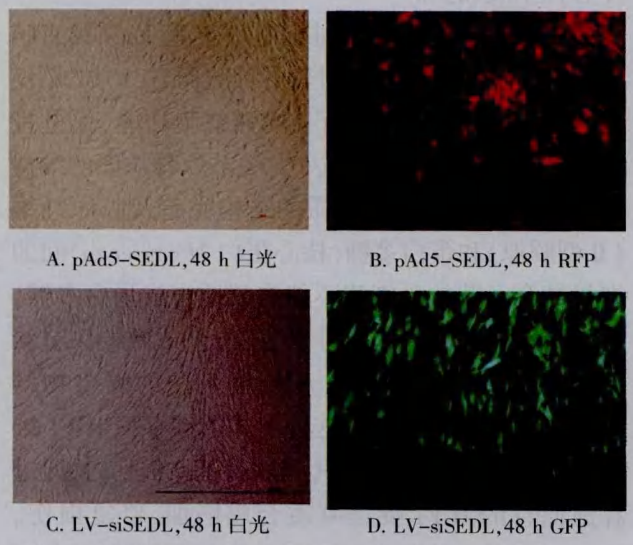
2.1 pAd5-SEDL 和 LV-siSEDL 成功感染人软骨细胞

pAd5-SEDL 感染人软骨细胞后表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein,RFP),LV-siSEDL 感染人软骨细胞后表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)。图 1 为病毒感染软骨细胞 48 h 后荧光图,大部分细胞均表达荧光,表示细胞成功感染人软骨细胞。

2.2 Real-time PCR 验证靶向 SEDL 的基因增强和干扰效果

将 pAd5-SEDL、LV-siSEDL 及相对应的阴性空载体病毒分别感染人软骨细胞 48 h 后,提取细胞总 RNA 通过 real-time PCR 进行检测。RNA 浓度、纯度良好,浓度波动于 271 μg/μl~347 μg/μl 范围,纯度(A260/A280)在 1.9~2.0 之间。pAd5-SEDL(2.14 ± 0.36) vs. 空载体(pAd5)(1.21 ± 0.25):a

P=0.022；LV-siSEDL(0.86 ± 0.11) vs. 空载体(LV)(1.34 ± 0.06)：b，P=0.003。见图 2。提取细胞总蛋白通过 Western blot 检测 sedlin 蛋白表达，pAd5-SEDL(0.56 ± 0.04) vs. 空载体(pAd5)(0.37 ± 0.05)：P=0.006；LV-siSEDL(0.13 ± 0.02) vs. 空载体(LV)(0.36 ± 0.04)：P=0.001。见图 3。

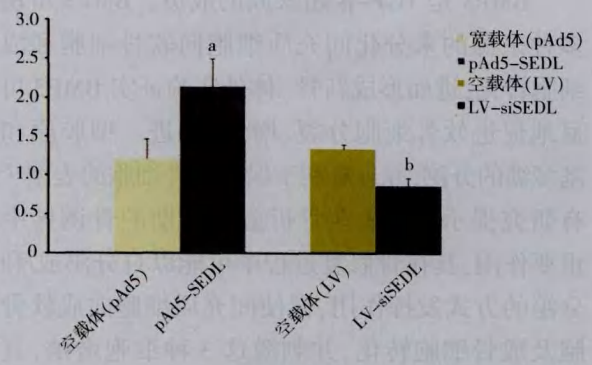


A. pAd5-SEDL，48 h 白光　B. pAd5-SEDL，48 h RFP

C. LV-siSEDL，48 h 白光　D. LV-siSEDL，48 h GFP

图 1　pAd5-SEDL 和 LV-SEDLsi 有效感染软骨细胞（100×）

Fig.1　Efficient infection of pAd5-SEDL and LV-SEDLsi（100×）



a. pAd5-SEDL vs. 空载体(pAd5)，P=0.022；

b. LV-siSEDL vs.空载体(LV)，P=0.003

图 2　4 组细胞 SEDL 基因 mRNA 表达（$\bar{x} \pm s$）

Fig.2　SEDL gene expression of four groups（$\bar{x} \pm s$）

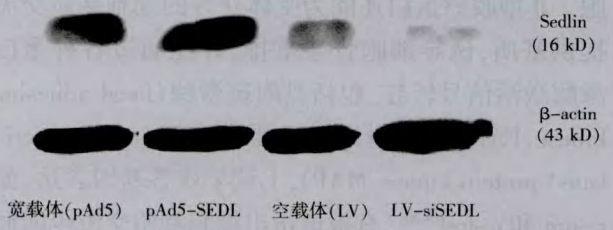


图 3　4 组细胞内 sedlin 蛋白表达情况

Fig.3　Expression of Sedlin in four groups

2.4　骨再生 PCR 芯片检测各组细胞骨发育相关基因表达变化

骨再生 PCR 芯片结果中，HC-a 内 SEDL 基因干扰后，芯片结果显示：基因上调 21 个，包括 AMBN、BMP2、BMP4、CALCR、CD36、CDH11、COL14A1、COL4A3、CTSK、DMP1、EGF、FGF1、FGFR2、IGF2、ITGAM、MMP2、NFKB1、TNF、TWIST、VEGFB、B2M；基因下调 5 个，包括 BMP3、COL2A1、FLT1、GDF10、IGF1。见图 4。

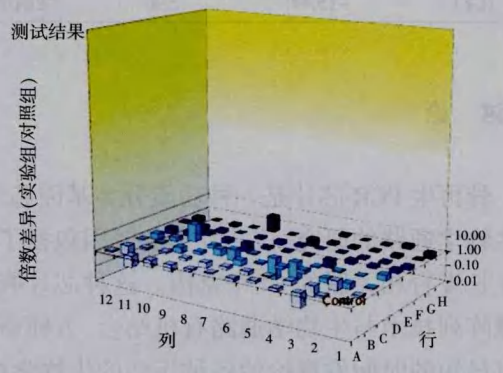


图 4　SEDL RNAi 软骨细胞基因芯片 3D 图

Fig.4　SEDL RNAi chondrocyte microarray 3D profile

HC-a 内 SEDL 基因增强后，骨再生 PCR 芯片结果显示：基因上调 27 个，包括 BMP3、COL10A1、COL14A1、COL15A1、COL2A1、COL3A1、COL4A3、CTSK、DMP1、EGFR、FGF3、FGFR1、FLT1、GDF10、IGF1、IGF1R、ITGAM、MMP2、NFKB1、PHEX、SMAD2、SMAD3、STATH、TGFBR1、VCAM1、VEGFB、B2M；基因下调 12 个，包括 ALPL、CD36、COL1A1、COL5A1、COMP、CSF、FGFR2、MMP8、MMP9、FGFB1、TNF、RPL13A(图 5)。

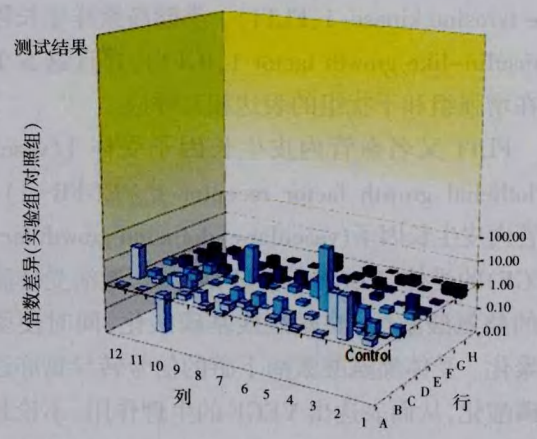


图 5　软骨细胞 SEDL 基因增强后基因芯片 3D 图

Fig.5　SEDL gene enhancer chondrocyte microarray 3D profile

在增强组与沉默组中差异表达且与软骨发育相关的基因有 5 个，分别为 COL2A、BMP3、FLT1、GDF10、IGF1，呈反向变化(表 1)。

表 1 基因芯片重要的差异表达基因

Tab.1 Important genes in osteogenesis PCR array

基因名称	表达变化（倍）		基因功能
	干扰组	增强组	
COL2A	-3.70	20.95	代谢相关
BMP3	-2.27	33.13	细胞生长分化
GDF10	-2.86	7.80	细胞生长分化
FLT1	-20.00	3.70	细胞增殖
IGF1	-15.44	2.90	细胞增殖

3 讨 论

骨再生 PCR 芯片是一种功能分类基因芯片，用于生物学通路的研究，该芯片上的基因包括了与骨骼生长发育相关联的 84 个基因。这种芯片有效地将微阵列技术与生物学通路有机结合，方便研究人员以最短的时间发现诊治各种疾病的生物学标志，该芯片可在单次实验中检测 84 个基因的 mRNA 水平，并进行定量，具有灵敏度高、样品的使用量低、重复性高、分辨率高、特异性好的特点。

结合干扰组和增强组骨再生 PCR 芯片结果分析，并通过查阅文献，发现了几个与软骨发育有重要关系的基因：Ⅱ型胶原蛋白（collagen，type Ⅱ，alpha 1，COL2A）、骨形态蛋白 3（bone morphogenetic protein 3，BMP3）、生长分化因子（growth differentiation factor 10，GDF10）、血管内皮生长因子受体 1（fms-like tyrosine kinase-1，FLT1）、类胰岛素样生长因子 1（insulin-like growth factor 1，IGF1），并且这 5 个基因在增强组和干扰组的表达相互呼应。

FLT1 又名血管内皮生长因子受体 1（vascular endothelial growth factor receptor 1，VEGFR-1），是血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）的受体，VEGF 与受体结合后，激活受体胞内段的酪氨酸激酶，酪氨酸残基磷酸化，同时使受体二聚化。受体酪氨酸激酶下游的信号转导物亦逐级被磷酸化，从而表达出 VEGF 的生理作用。不论是膜内成骨还是软骨内成骨都离不开同时进行的血管生成。只有这样，才能在成骨部位出现成骨细胞和破骨细胞的前身细胞。膜内成骨时，局部的毛细血管伸入成骨中心内，继而出现间充质细胞向成骨细胞分化的现象。在这一过程后，成骨细胞分泌基质蛋白和其他相关蛋白，为基质矿化提供场所，形成交织骨，并最后重建成板层骨。在软骨内成骨过程中，VEGF 是钙化性吸收、新生血管生成和软骨内成骨的必需因子。在骨组织中，血管生成和骨生成是协调进行和相互影响的[5-6]。因此，血管生成障碍必然伴有骨生成减少。

IGF1 是一种既有促进细胞增殖活性，又具有胰岛素样作用的多肽[7-8]。对软骨细胞而言，IGF1 不仅能刺激细胞分裂增殖，而且增强细胞功能，促进蛋白多糖及Ⅱ型胶原的合成[9-10]。关节软骨功能的维持几乎完全依赖于软骨基质的结构完整及胶原纤维（Ⅱ型胶原）和蛋白多糖（核心蛋白为 aggrecan）间的有机结合。若软骨细胞不能有效地合成蛋白多糖，那将严重影响了软骨的力学性能[11]。成熟的关节软骨，IGF1 通过与 IGFBP3 和纤连蛋白的复合物结合，储存在软骨囊基质，这种形式的储存使 IGF1 维持在一个相对稳定的水平，当软骨基质损伤时，通过释放储存的 IGF1 促进基质合成增加，修复损伤。IGF1 在维护和修复关节软骨上具有重要的作用，而 IGF1 的功能障碍将导致关节软骨进行性退化[7]。

BMP3 是 TGF-β 超家族的成员。BMP3 可诱导多种来源的未分化间充质细胞向软骨细胞和成骨细胞转化，进而形成新骨。体外实验证实 BMP3 可明显地促进软骨细胞分裂、增值，促进二型胶原和氨基多糖的分泌，并且有利于保持软骨细胞的表型[12-13]。有研究提示 BMP3 在骨折愈合早期的骨诱导中起重要作用，其在骨修复过程中可能以自分泌或/和旁分泌的方式发挥作用，促使间充质细胞向成软骨细胞及成骨细胞转化，并刺激这 3 种细胞增殖，直到达到维持增长骨代谢平衡水平[14]。

Ⅱ型胶原蛋白是软骨细胞外基质的主要结构蛋白，干重占 30%~60%，Ⅱ型胶原蛋白在 XI 型、IX 型胶原蛋白协助下形成纤维原，纤维原结合多聚寡糖和水后膨胀，形成的结构可以抵御外压，保护细胞。Ⅱ型胶原蛋白还能为受体介导的细胞基质交流提供基质，诱导细胞骨架重排，并能通过各种蛋白激酶激活信号转导，包括黏附斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）和丝裂原激活蛋白激酶（mitigen activated protein kinase，MAP），上调早应答基因表达，如 c-jun 和 c-fos[15-20]。有报道指出细胞基质交流也能调节细胞凋亡。1997 年 Yang 等构建了纯合子转基因小鼠，利用基因敲除技术使鼠内Ⅱ型胶原蛋白沉默，

通过体外实验研究细胞外基质基质对软骨细胞存活的影响，结果显示Ⅱ型胶原蛋白，作为软骨细胞外基质的主要成分，它的缺失会使软骨细胞走向凋亡[21]。此外，在脊椎骨骺发育不良(spondyloepiphyseal dysplasia，SED)的 3 种类型中，其中先天性脊椎骨骺发育不良和轻度脊椎骨骺发育不良伴早期关节病与 COL2A1 基因突变有关，而SEDT 与 SEDL 基因突变有关，因此猜测SEDL 基因突变引起 COL2A1 基因表达变化可能与 SEDT 的发病机制相关。

通过基因芯片检测，筛选出了 SEDL 基因突变后人软骨细胞内骨发育相关差异表达基因，为进一步研究 SEDT 的发病机制提供科研基础。这 5 个有差异基因在 SEDT 发病中是否有作用，尚需进一步的研究论证。

参 考 文 献

[1] Gedeon AK，Colley A，Jamieson R，et al.Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda[J].Nat Genet，1999，22(4)：400-404.

[2] Xia XY，Yu J，Li WW，et al.A novel nonsense mutation in the sedlin gene(SEDL) causes severe spondyloepiphyseal dysplasia tarda in a five-generation Chinese pedigree[J].Genet Mol Res，2014，13(2)：3362-3370.

[3] Venditti R，Scanu T，Santoro M，et al.Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle[J].Science，2012，337(6102)：1668-1672.

[4] Mumm S，Zhang X，Vacca M，et al.The sedlin gene for spondyloepiphyseal dysplasia tarda escapes X-inactivation and contains a non-canonical splice site[J].Gene，2001，273(2)：285-293.

[5] Martinez P，Esbrit P，Rodrigo A，et al.Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells[J].Osteoporosis International，2002，13(11)：874-881.

[6] Rabie A，Leung F，Chayanupatkul A，et al.The correlation between neovascularization and bone formation in the condyle during forward mandibular positioning[J].Angle Orthod，2002，72(5)：431-438.

[7] Solheim E.Growth factors in bone[J].International Orthopaedics，1998，22(6)：410-416.

[8] Trippel SB.Growth factor actions on articular cartilage[J].Journal Rheumatol Suppl，1995(43)：129-132.

[9] Fortier LA，Lust G，Mohammed HO，et al.Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin - like growth factor-I[J].J Orthop Res，1999，17(4)：467-474.

[10] McQuillan DJ，Handley CJ，Campbell MA，et al.Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serun and insulin-like growth factor-1in cultured bovine articular cartilage[J].Biochem J，1986，240(2)：423-430.

[11] Martin J and Buckwalter J.The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage[J].Biorheology，2000，37(1)：129-140.

[12] 韩一生，胡蕴玉.重组 PcDNA3—hBMP3 转染兔关节软骨细胞和对其增殖的影响[J].中华骨科杂志，2000，20(6)：366-371.

[13] 韩一生，惠宏襄，崔大祥，等.人骨形态蛋白-3 基因真核表达载体(PcDNA3-hBMP3)构建[J].第四军医大学学报，1999，20(4)：313.

[14] 刘 建，胡蕴玉.骨折愈合过程中 BMP3 基因表达的实验研究[J].中华外科杂志，1996，34(10)：585-588.

[15] Chen Q，Kinch MS，Lin TH，et al.Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases[J]Journal of Biological Chemistry，1994，269(43)：26602-26605.

[16] Clark EA，Brugge JS.Integrins and signal transduction pathways：the road taken[J].Science，1995，268(5208)：233-239.

[17] Dürr JGS，Potocnik A，von der Mark H，et al.Localization of beta 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin[J].Exp Cell Res，1993，207(2)：235-244.

[18] Schaller MD ，Thomas Parsons J.Focal adhesion kinase and associated proteins[J].Curr Opin Cell Biol，1994，6(5)：705-710.

[19] Schlaepfer DD，Hanks SK，Hunter T，et al.Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase[J].Nature，1994，372(6508)：786-791.

[20] Shaw R，Doherty D，Ritter A，et al.Adherence-dependent increase in human monocyte PDGF(B) mRNA is associated with increases in c-fos，c-jun，and EGR2 mRNA[J]J Cell Biology，1990，111(5)：2139-2148.

[21] Yang C，Li SW，Helminen HJ，et al.Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen Ⅱ[J].Exp Cell Res，1997，235(2)：370-373.

（责任编辑：关蕴良）