

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.011

FoxO1 在新疆维吾尔族先天性马蹄内翻足的表达及其临床意义*

程国杰,艾克巴尔·阿不都热西提,王晶,吕发明,董豪杰
(新疆医科大学附属中医医院骨一科,乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的** 探讨 FoxO1 基因在新疆维吾尔族先天性马蹄内翻足(CTEV)中的表达及 FoxO1 与先天性马蹄内翻足畸形程度的相关性。**方法** 运用 Western Blot 方法检测新疆地区 51 例维吾尔族先天性马蹄内翻足患儿和 25 例维吾尔族健康儿童足部肌肉组织中 FoxO1 蛋白表达水平;应用实时荧光定量 PCR 测定不同畸形程度维吾尔族先天性马蹄内翻足患儿 FoxO1 mRNA 相对表达量。**结果** Western Blot 检测结果显示 ICTEV 患儿 FoxO1 蛋白表达水平(0.52 ± 0.23)低于正常儿童(1.61 ± 0.15),两组比较差异有统计学意义($P=0.017$)。实时荧光定量 PCR 检测显示,Dimeglio II、III、IV 型 ICTEV 的 FoxO1 mRNA 相对表达量分别为 1.02 ± 0.24 、 0.67 ± 0.15 、 0.24 ± 0.19 ;维吾尔族 ICTEV 畸形程度与 FoxO1 mRNA 相对表达量呈负相关性($P=0.039$)。**结论** FoxO1 基因转录水平随 ICTEV 畸形程度的加重而逐渐降低,提示 FoxO1 基因可能参与了维吾尔族 ICTEV 的整个发病过程。

[关键词] 先天性马蹄内翻足;FoxO1;基因表达;维吾尔族;畸形程度

[中图分类号] R582.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2340-03

Expression and clinical significance of FoxO1 in idiopathic congenital talipes equinovarus in Uigur of Xinjiang*

Cheng Guojie, Aikebaer · Abudurexiti, Wang Jing, Lv Faming, Dong Haojie

(Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of FoxO1 gene in idiopathic congenital talipes equinovarus(CTEV) in Xinjiang Uigur and its correlation with deformity degree of ICTEV. **Methods** The FoxO1 protein expression level of foot muscle tissues in 51 Uigur children cases of ICTEV and 25 Uigur normal children were detected by Western blot, the relative expression level of FoxO1 mRNA in different deformity degrees of ICTEV was detected by using real time fluorescence quantitative PCR. **Results** The Western Blot detection results showed that the expression level of FoxO1 protein in ICTEV children patients was (0.52 ± 0.03), which was lower than (1.61 ± 0.15) in normal children, the difference was statistically significant ($P=0.017$). The real time fluorescence quantitative PCR detection showed that the relative expression level of FoxO1 mRNA in the Dimeglio type II, III and IV were 1.02 ± 0.24 , 0.67 ± 0.15 and 0.24 ± 0.19 respectively. There was negative correlation between the deformity degree of ICTEV and FoxO1 mRNA relative expression level. **Conclusion** The transcription level of FoxO1 gene is gradually decreased with the deformity degree aggravation of ICTEV, suggesting that the FoxO1 gene may involve in the whole onset process of Uigur ICTEV.

[Key words] ICTEV; FoxO1; gene expression; Uigur nationality; degree of deformity

先天性马蹄内翻足(CTEV)是儿童常见的足功能先天畸形,由足下垂、足内翻、足内收 3 种主要畸形综合而成^[1]。目前 ICTEV 发病原因尚未明确,相关研究提示:遗传因素、血管畸形、环境因素、骨骼发育异常和神经肌肉病变与 ICTEV 的发生、发展存在关联^[2-4],由于 ICTEV 好发于胚芽发育易损期,某些与肢体发育、血管发育相关基因受遗传或环境等因素作用而出现异常表达,进一步加重 ICTEV 的畸形程度^[5-6]。FoxO1 基因是一类 DNA 结合区具有翼状螺旋结构的转录因子,通过招募共激活因子而调控 I 型肌纤维基因转录表达,且在维持肢体发育、造血干细胞生长和免疫调节方面发挥重要作用^[7-8]。国外研究发现,缺失 FoxO1 基因的实验小鼠存在严重的血管畸形现象,但是关于 FoxO1 基因与 ICTEV 的相关性研究未有报道,尤其对于 ICTEV 高发人群 FoxO1 基因与 ICTEV 致病、畸形程度的研究更未出现,因此探讨 FoxO1 基因在 ICTEV 高

发人群——新疆维吾尔族人的表达情况^[9],以及不同畸形程度 ICTEV 患者的表达水平,是进一步了解 ICTEV 致病原因的有效方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 2 月至 2015 年 11 月就诊于新疆医科大学附属中医医院创伤骨科的 51 例维吾尔族 ICTEV 患儿作为 ICTEV 组。诊断标准:所有患儿均表现为足下垂,后跟向上,足外侧缘着地及足底向后,形似高尔夫球棒;畸形程度按 Dimeglio 分类方法分为畸形 I 型(姿势形)、II 型(轻度畸形)、III 型(严重畸形)、IV 型(畸形非常严重)。25 例维吾尔族健康儿童足部肌肉组织标本由新疆医科大学附属中医医院创伤骨科和喀什市人民医院提供(健康对照组)。本研究中 ICTEV 患儿和健康儿童的家长均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160215)。 作者简介:程国杰(1973—),硕士,副主任医师/副教授,主要从事老年髋骨骨折围术期治疗,肩部创伤中西医结合治疗方面的研究。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应相关引物

名称	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	扩增片段(bp)
FoxO1	F:AATTCAATTTCGTTCATAATCTGTC	56	204
	R:GAAATGTACTCCAGTTATCAAAG		
β-actin	F:TCACCCACACTGCCATCTACGA	56	205
	R:CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG		

表 2 两组一般资料比较

组别	n	Dimeglio 畸形分类[n(%)]				P	性别[n(%)]			地区分布[n(%)]			年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)
		I型	II型	III型	IV型		男	女	P	北疆	南疆	P	
ICTEV 组	51	0(0.00)	13(25.49)	22(43.14)	16(31.37)	>0.05	35(68.63)	16(31.37)	>0.05	13(25.49)	38(74.51)	<0.05	4.4±5.9
健康对照组	25	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	>0.05	15(60.00)	10(40.00)	>0.05	11(44.00)	14(56.00)	>0.05	4.4±6.2
P		>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

1.2.1 组织蛋白、mRNA 提取 取两组研究对象足部肌肉组织 50 mg,于低温环境下剪碎,加入 5 mL 组织裂解液[Tris-HCl pH7.5 20 mmol/L,蔗糖 330 mmol/L,乙二胺四乙酸(EDTA)2 mmol/L,苯甲基磺酰氨(PMSF)1 mmol/L]进行组织裂解,4 °C 1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,将沉淀物置于裂解液中超声破碎 10 min,重复 1 次超声,收集上清液,低温保存蛋白样品。应用 TriZol 提取试剂盒(Invitrogen)提取两组研究对象足部肌肉组织总 RNA,使用 MLV 反转录试剂盒(Invitrogen)进行 RNA 反转录,将反转录产物 cDNA 置于-80 °C 低温保存。

1.2.2 Western Blot 方法检测 FoxO1 在两组足部肌肉组织的表达情况 取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,将电泳胶和 PVDF 膜进行转膜、封闭;使用 1 : 300 稀释的鼠抗人 FoxO1 抗体和鼠抗人 β-actin 抗体室温杂交 1 h;1 : 2 000 稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠(二抗)室温孵育 1 h。条带经 Odyssey 红外线荧光扫描仪扫描后,采用 Image-ProPlus 图像分析软件分析。以目的蛋白条带与内参蛋白条带的光密度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 方法检测 FoxO1 mRNA 在不同畸形程度 ICTEV 的转录水平 利用 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMIX kit(Invitrogen)进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系(25.0 μL):SYBR® Green Realtime PCR Mix 12.5 μL,上游引物 1.0 μL,下游引物 1.0 μL,cDNA 样品 2.0 μL,去离子水 8.5 μL;反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环。收集各扩增反应 Ct 值,mRNA 相对表达量 $2^{-\Delta Ct} = CT_{目的基因} - CT_{看家基因}$ 。扩增引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,见表 1。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad prism5.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 ICTEV 组和健康对照组的性别、地区分布、年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$);两组畸形分类比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。ICTEV 组中南疆地区病例数高于北疆地区,ICTEV 分布差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.2 两组研究对象足部肌肉组织中 FoxO1 的表达情况 IC-

TEV 组 FoxO1 蛋白相对表达量为 0.52 ± 0.23 ,健康对照组为 1.61 ± 0.15 ,ICTEV 组 FoxO1 蛋白表达水平低于健康对照组,两组比较差异有统计学意义($P = 0.017$),见图 1、2。

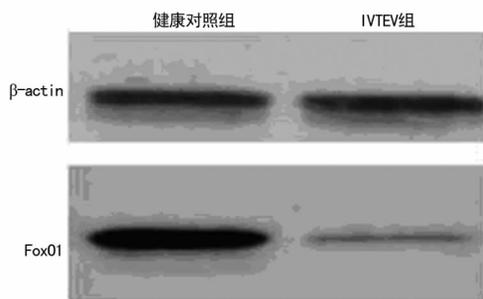


图 1 FoxO1 蛋白在两组儿童足部肌肉组织中的表达

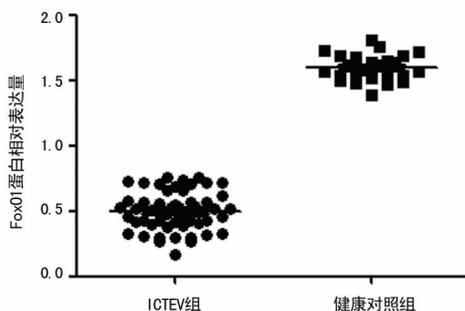


图 2 两组儿童足部肌肉组织中 FoxO1 蛋白相对表达量

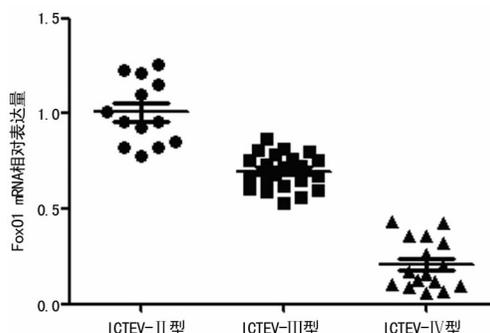


图 3 不同畸形程度 ICTEV 患儿足部肌肉组织中 FoxO1 mRNA 相对表达量

2.3 FoxO1 mRNA 转录水平与 ICTEV 畸形程度的关系 实

时荧光定量 PCR 检测结果显示, II、III、IV 型 ICTEV 患儿 FoxO1 mRNA 相对表达量分别为 1.02 ± 0.24 , 0.67 ± 0.15 , 0.24 ± 0.19 ; IV 型 ICTEV 患儿 FoxO1 mRNA 转录水平低于 II、III 型 ICTEV 患儿, 比较差异有统计学意义 ($P=0.039$), 见图 3。

3 讨论

CTEV 是一类常见骨科出生缺陷, 严重影响患儿的身体和心理健康, 临床上虽然可以通过畸形矫正手术达到改善 ICTEV 外观和功能的作用, 但仍有多数患儿不能得到有效治疗, 此外 ICTEV 致病原因尚未明确, ICTEV 临床根治困难较大。近年国内外 ICTEV 相关研究表明, 遗传因素、血管畸形、环境因素、骨骼发育异常和神经肌肉病变与 ICTEV 的发生、发展存在关系, 一些研究人员对 ICTEV 患者进行足部血管造影, 发现患者足部均有血管异常, 血管排列紊乱, 且在胎儿早起改变明显。Kanfman 等^[10]应用绒毛膜绒毛取样的方法, 建立肢体畸形动物模型, 发现畸形动物血管断裂或发育缺陷以及缺血导致缺氧, 影响胚芽的形成, 最终导致 ICTEV 的发生。

FoxO1 是 FoxO 蛋白家族中发现最早的成员之一, 它能促进脂肪、血管等细胞分化, 且在细胞凋亡、DNA 损伤/修复、血管形成和肿瘤发生等生物过程中发挥重要作用。FoxO1 受 PI3K/AKT 信号通路的磷酸化调控, 导致转录活性下调, 从而抑制 FoxO1 所调控的下游基因表达^[11-12]。Quaresma 等^[13]研究发现 PI3K/AKT 信号通路与一些细胞过程密切相关, 间接证实 FoxO1 基因在细胞凋亡、血管损伤与修复、血管生成和肿瘤形成等生理过程中发挥关键作用。德国科学家 Wilhelm 等^[14]通过敲出小鼠内皮细胞内的 FoxO1 基因, 发现 FoxO1 参与了小鼠血管生成过程, 能够协调细胞分裂与代谢过程, 而在正常情况下 FoxO1 能够防止细胞分裂出现失控, 保护血管发挥正常功能, 一旦 FoxO1 失去表达平衡状态, 血管内皮细胞的生长就会失去控制, 出现严重的血管畸形现象。

本研究对新疆维吾尔族 ICTEV 患儿和健康维吾尔族儿童 FoxO1 蛋白表达水平进行检测, 结果显示, ICTEV 患儿 FoxO1 蛋白相对表达水平 (0.52 ± 0.23) 低于健康儿童 (1.61 ± 0.15), 两者差异有统计学意义 ($P=0.017$)。表明 ICTEV 的产生与 FoxO1 基因有一定关系, ICTEV 患儿 FoxO1 蛋白的低表达水平可能减缓了患儿血管内皮细胞代谢和细胞分裂, 导致血管生长受到影响, 阻碍肌肉细胞接触氧气和营养成分, 进而引起血管畸形和 ICTEV 的发生。为了进一步证实 ICTEV 与 FoxO1 基因表达之间的关系, 本研究对不同畸形程度的 ICTEV 患儿 FoxO1 mRNA 转录水平进行检测, 结果显示, 随着 ICTEV 畸形程度的不断加重, FoxO1 mRNA 相对表达量在不断降低, 尤其是 IV 型 ICTEV 患儿 FoxO1 mRNA 相对表达量仅为 0.24 ± 0.19 , 明显低于 II、III 型 ICTEV 患儿 (1.02 ± 0.24 , 0.67 ± 0.15), 组间比较差异有统计学意义 ($P=0.039$), 实验表明 FoxO1 基因不仅参与了 ICTEV 的产生, 可能在 ICTEV 整个致病过程中发挥重要作用。因此, 作者推断 FoxO1 基因在 ICTEV 患儿足部肌肉组织中异常表达, 可能受到 PI3K/AKT 信号通路过度磷酸化调控, 引起 FoxO1 mRNA 转录和蛋白表达水平的降低, 从而抑制 FoxO1 下游基因正常表

达, 减缓了 ICTEV 患儿肌肉组织中血管内皮细胞代谢和分裂, 导致血管畸形的发生。另外, 随着患者畸形程度的不断加重, PI3K/AKT 信号通路的过度调控并没有得到恢复, 而是进一步降低了 FoxO1 活性和表达水平, 引起 ICTEV 患儿肌肉组织血管畸形的不断恶化。另外, 同一时期南疆地区 ICTEV 患儿数高于北疆地区, 分布差异有统计学意义 ($P>0.05$), 表明 ICTEV 发病存在地域和环境差异性; 但本研究不能排除因 FoxO1 基因错位突变导致 ICTEV FoxO1 基因表达异常的可能性, 而 ICTEV 是否存在 FoxO1 基因突变、突变对 ICTEV 影响大小, 以及基因突变所产生的致病机制尚未有报道, 有待研究人员进一步探索。

参考文献

- [1] 司晓凤, 叶姣, 王玉辉, 等. 先天性马蹄内翻足病因的研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 2014, 16(3): 181-184.
- [2] Radler C. The Ponseti method for the treatment of congenital club foot[J]. Int Orthop, 2013, 37(9): 1747-1753.
- [3] 葛茂林, 李昶. 先天性马蹄内翻足研究进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2014, 23(11): 977-980.
- [4] 易玲, 周光萱, 代礼, 等. 2001—2010 年中国先天性马蹄内翻足的流行病学分析[J]. 四川大学学报(医学版), 2013, 44(4): 606-609.
- [5] Gibbons PJ, Gray K. Update on clubfoot[J]. J Paediatr Child Health, 2013, 49(9): E434-437.
- [6] Dobbs MB, Gurnett CA. Genetics of clubfoot[J]. J Pediatr Orthop B, 2012, 21(1): 7-9.
- [7] 黄宁, 李文佳, 安利国, 等. FoxO1 的功能及其与人类疾病的关系[J]. 生命科学, 2012, 24(4): 334-339.
- [8] 关尚一. FoxO 转录因子在运动骨骼肌领域的研究进展[J]. 当代体育科技, 2013, 3(24): 22-23.
- [9] 陈志泉, 何远生, 张付军. 新疆喀什地区维吾尔族先天性马蹄内翻足流行病学调查报告[J]. 中华小儿外科杂志, 1998, 4(19): 107-109.
- [10] Kanfman M, Lngang HH. Studies of the mechanism of amniotic in mice[J]. Int J Dev Biol, 2000, 44(1): 161-175.
- [11] Farmer SR. The forkhead transcription factor FoxO1: a possible link between obesity and insulin resistance[J]. Mol Cell, 2003, 11(1): 6-8.
- [12] Sykes SM, Lane SW, Bullinger LA, et al. AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias[J]. Cell, 2011, 146(5): 697-708.
- [13] Quaresma AJ, Sievert R, Nickerson JA. Regulation of mRNA export by the PI3 kinase/AKT signal transduction pathway[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(8): 1208-1221.
- [14] Wilhelm K, Happel K, Eelen G, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium[J]. Nature, 2016, 529(7585): 216-220.