

论著·临床研究

转化生长因子 β_2 在发育性髋关节发育不良 患儿关节囊的分布和表达

史立伟¹ 赵群¹ 张立军¹ 李连永¹ 高红²

(中国医科大学附属盛京医院 1. 小儿外科; 2. 卫生部小儿先天畸形重点实验室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨发育性髋关节发育不良(DDH)患儿和非DDH儿童TGF- β_2 在关节囊的免疫组化分布规律与水平差异,并比较TGF- β_2 在mRNA水平的表达差异,以探索髋关节松弛的原因。方法 选取性别相同、年龄相近的8对DDH(发育性髋关节脱位)患儿与非DDH儿童进行配对研究,采用S-P法免疫组化技术和半定量RT-PCR技术检测关节囊中TGF- β_2 的分布规律与水平差异,以及mRNA水平的差异。结果 分泌TGF- β_2 的成纤维细胞于贴关节侧的滑膜层呈强阳性表达,内部纤维层阳性表达细胞稀疏,强度减弱。DDH组与对照组配对比较,纤维层中有阳性成纤维细胞百分比及局部染色的灰度值较对照组明显减少,差异有统计学意义, $P < 0.01$ 。DDH组关节囊TGF- β_2 mRNA的表达较对照组减少,差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。结论 DDH患儿的髋关节松弛很可能与关节囊中TGF- β_2 的分布减少和表达异常有关。 [中国当代儿科杂志,2010,12(8):641-644]

[关键词] 发育性髋关节发育不良;关节松弛;关节囊;转化生长因子;儿童

[中图分类号] R179 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)08-0641-04

Distribution and expression of TGF- β_2 in the capsule of children with developmental dysplasia of the hip

SHI Li-Wei, ZHAO Qun, ZHANG Li-Jun, LI Lian-Yong, GAO Hong. Department of Pediatric Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Zhao Q, Email: rezh2001@yahoo.com)

Abstract: Objective This study examined the distribution and expression of transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) in the hip capsule of children with developmental dysplasia (dislocation) of the hip (DDH) and non-DDH children in order to investigate the roles of TGF- β_2 in hip joint laxity. **Methods** Eight children with DDH and eight age- and gender-matched non-DDH children (control group) were enrolled. The immunohistochemical technique (S-P method) was used to examine the distribution and content of TGF- β_2 in the hip capsule. Semiquantitative RT-PCR method was used to detect mRNA expression of TGF- β_2 in the hip capsule. The quantitative analysis of TGF- β_2 was performed by professional image software. **Results** A high expression of TGF- β_2 was observed in the synovial layer with fibroblast regularly arranged parallel to the joint surface. There was decreased expression of TGF- β_2 in the fibrous layer of the capsule. The percentage of positive fibroblasts and the gray-scale density in the fibrous layer in the DDH group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). TGF- β_2 mRNA expression in the DDH group decreased compared with that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The decreased TGF- β_2 in distribution, content and mRNA expression in the hip capsule might contribute to hip joint laxity in children with DDH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (8):641-644]

Key words: Developmental dysplasia of the hip; Joint laxity; Capsule; Transforming growth factor; Child

发育性髋关节发育不良(developmental dysplasia of the hip, DDH)的病因目前不明,全身或局部关节松弛理论是机械因素导致DDH发生的假说之一。有许多学者认为DDH可能是一种发生在结缔组织的遗传性疾病,很可能与细胞外基质成分有关,如胶

原蛋白、蛋白质多糖、弹力纤维等^[1]。关节过度活动也系由关节囊及韧带松弛而来,有许多学者推测它很可能与某些细胞外基质成分有关^[1]。研究发现胶原蛋白在DDH患者关节囊中表达异常^[2]。本研究拟针对与胶原蛋白合成和降解过程密切相关,

[收稿日期]209-12-30;[修回日期]2010-02-25
[基金项目]国家自然科学基金资助(项目批准号:30600654)
[作者简介]史立伟,男,博士,讲师。
[通信作者]赵群,教授。

并且是关节囊和圆韧带重要组成成分的生长因子 β_2 (TGF- β_2)进行研究。TGF- β_2 是调控I型胶原基因表达的关键性细胞因子,能促进成纤维细胞的生长、分裂,并能调节胶原蛋白的分泌,是骨科学中纤维异常相关研究的方向之一。目前尚未见TGF- β_2 在DDH中的相关报道。本研究以DDH患儿髋关节囊为研究对象,观察TGF- β_2 在关节囊的分布与定位,并比较TGF- β_2 在转录水平的表达差异,试从病理形态和分子水平揭示DDH患儿髋关节松弛的机理。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

本研究共收集DDH(发育性髋脱位)髋关节囊标本64例,年龄1~12.5岁,平均 4.9 ± 3.7 岁。男性13例,女性51例,均无家族史,不合并其他畸形。标本来源方式:手术复位中经紧缩后切除的髋关节上方多余关节囊。收集对照组儿童髋关节囊标本14例,年龄0.8~13岁,平均 6.5 ± 3.0 岁,男性6例,女性8例。标本来源方式:4例为外伤性髋脱位,10例为非脑源性意外死亡后尸检(死亡3h内尸检)。取材部位及方法同DDH组。所有病例组和对照组的儿童,按照年龄相近、性别相同的条件进行组间配对,成功配对8组患者,此8组患者作为本研究的实验对象。

以上标本获取均获得监护人书面授权,并获得医院伦理委员会书面认可。

1.2 免疫组化

1.2.1 试剂 TGF- β_2 兔抗人多克隆抗体(ab53778),购于Abcam生物制剂公司;即用型免疫组化S-P超敏试剂盒(兔)购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2.2 方法 剪取关节囊全层厚小组织块置于体积分数4%多聚甲醛溶液中室温固定48h,75%、85%、95%、100%乙醇溶液各24h梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成4 μ m厚切片。采用S-P法:石蜡切片脱蜡至水,用PBS冲洗3min \times 3次;加入柠檬酸和柠檬酸钠修复液,微波修复组织抗原;每张切片加1滴或50 μ L过氧化酶阻断溶液,室温下孵育10min,PBS冲洗3min \times 3次;除去PBS,每张切片加50 μ L非免疫山羊血清,室温下孵育10min;除去血清,每张切片加1滴或50 μ L的多克隆兔抗人

TGF- β_2 一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C过夜;PBS冲洗3min \times 3次;除去PBS,每张切片加50 μ L生物素标记的二抗(羊抗兔IgG),室温下孵育10min;PBS冲洗3min \times 3次;除去PBS,每张切片加50 μ L链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育10min;PBS冲洗3min \times 3次;除去PBS,每张切片加100 μ L新鲜配制的DAB溶液,显微镜下观察3~10min,阳性染色为棕色;自来水冲洗,苏木素复染,脱水,透明,封片,镜下观察。

成纤维细胞周围出现环绕棕色深染及细胞外基质出现波浪样或网状棕色深染均为阳性表现。每张切片在纤维层内随机选取3个40 \times 10倍视野,计数其中有阳性表现的成纤维细胞数,并计算出该细胞占总计数成纤维细胞的百分比。每张切片在纤维层内选取细胞数 <50 的3个20 \times 10倍视野,测量平均灰度值来反映着色深浅,进而判定反应强度。平均灰度值测量应用中国医科大学卫生部小儿外科重点实验室处享有版权的NIS-Elements BR 2.10软件包。

1.3 RT-PCR

1.3.1 组织总RNA提取 关节囊组织总RNA提取按照Invitrogen公司(美国)提取试剂盒说明书操作。紫外分光光度计检测提取物RNA浓度和纯度,其纯度为1.65~1.92。

1.3.2 逆转录合成cDNA 参照TAKARA公司(大连)逆转录试剂盒说明书进行。在20 μ L反应体系中分别加入样本RNA模板4 μ L,2X缓冲液20 μ L;25mmol MgSO₄ 8 μ L;10mmol dNTPs 2 μ L;22U/ μ L AMV 2 μ L;50 μ mol/L Oligo-dT 2 μ L;40U/ μ L RNase Inhibitor 1 μ L;ddH₂O 1 μ L。混匀后置于下列温度反应:65 $^{\circ}$ C 1min,30 $^{\circ}$ C 5min,于30min内匀速升温至65 $^{\circ}$ C,65 $^{\circ}$ C 30min,98 $^{\circ}$ C 5min,5 $^{\circ}$ C 5min。产物即为cDNA。

1.3.3 PCR 在25 μ L反应体系中,分别加入cDNA、ddH₂O、PCR缓冲液(10 \times)、dNTPs(各2.5mmol/L)、Taq DNA聚合酶(5U/ μ L)及待测指标的上游引物和下游引物;引物终浓度为5~20pmol。各指标及内参 β -actin引物的序列、扩增条件见表1。

1.3.4 PCR产物电泳及检测 反应结束后,取反应产物10 μ L在含有溴化乙锭的2%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下检查特异条带,电泳凝胶成像系统成像,应用Scion Image软件(Scion,美国)对条带灰度进行半定量分析。

表1 PCR引物序列及产物长度

引物名称	核苷酸序列	产物长度(bp)	Genbank	循环条件
TGF- β_2				94°C 3 min, 94°C 40 s
上游	5'-GAGGAGCGACGAAGAGTA-3'	105	NM003238	50.5°C 1 min, 72°C 1 min
下游	5'-AAGTAGGGTCTGTAGAAAAGTG-3'			35个循环后, 72°C 7 min
β -actin				94°C 3 min, 94°C 40 s
上游	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	498	D501A	55.5°C 1 min, 72°C 1 min
下游	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'			35个循环后, 72°C 7 min

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0软件进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用配对 *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β_2 髌关节囊分布规律免疫组化结果

可见 TGF- β_2 主要在成纤维细胞周边表达, 为波浪样或网状棕色深染, 不论是 DDH 组, 还是对照组, 分泌 TGF- β_2 的成纤维细胞在贴近关节侧的滑膜层都明显多于关节囊深层, 于滑膜层都呈强阳性表达, 并与滑膜缘平行排列, 阳性表达成份密集。内部纤维层阳性表达成份稀疏, 强度明显减弱。见图 1。

对免疫组化染色切片的显微镜观测及图像数据处理, 发现 DDH 组关节囊有阳性表现的成纤维细胞数的比率明显少于对照组, *P* < 0.01, 差异有统计学意义; 并且其染色局部的灰度值也低于对照组, *P* < 0.05, 差异有统计学意义。见表 2。

2.2 RT-PCR 检测关节囊中的 TGF- β_2 mRNA 结果

RT-PCR 检测关节囊组织中的 TGF β_2 mRNA, 进行琼脂糖凝胶电泳, 再通过电泳条带灰度进行半定量分析, 结果显示 DDH 组髌关节囊中 TGF- β_2 mRNA 的表达较对照组明显减少, 差异有统计学意义, *P* < 0.05。见表 3。



图1 关节囊中 TGF- β_2 的表达 ($\times 400$) A 为对照组, B 为 DDH 组。红色箭头示滑膜层, 黑色箭头示关节囊深层。图中可见, 不论对照组, 还是 DDH 组, 分泌 TGF- β_2 的成纤维细胞在贴近关节侧的滑膜层明显多于关节囊深层; 同时可见 DDH 组关节囊有阳性表现的成纤维细胞数明显少于对照组。TGF- β_2 阳性表达呈棕褐色。

表2 两组 8 对关节囊 TGF- β_2 免疫组化结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

编号	对照组		DDH 组	
	阳性成纤维细胞 %	灰度值	阳性成纤维细胞 %	灰度值
1	60.2 \pm 4.9	145.0 \pm 22.0	47.0 \pm 1.2	87.4 \pm 15.1
2	67.5 \pm 1.9	132.7 \pm 24.3	48.1 \pm 11.9	88.3 \pm 14.2
3	43.0 \pm 1.6	124.5 \pm 11.1	23.8 \pm 6.0	93.9 \pm 18.3
4	31.7 \pm 5.1	118.4 \pm 13.1	23.2 \pm 1.8	113.5 \pm 12.5
5	24.2 \pm 6.2	128.2 \pm 10.2	10.7 \pm 2.9	97.3 \pm 17.3
6	44.3 \pm 0.5	138.3 \pm 8.5	25.8 \pm 4.7	129.6 \pm 20.5
7	75.9 \pm 5.4	123.3 \pm 14.7	58.8 \pm 4.6	132.8 \pm 23.7
8	58.4 \pm 2.6	141.8 \pm 17.0	43.5 \pm 3.0	138.2 \pm 11.1

注: 两组阳性成纤维细胞比率比较, *t* = 11.68, *P* < 0.01; 阳性染色区灰度值比较, *t* = 2.62, *P* < 0.05

表3 两组 8 对关节囊 TGF- β_2 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

编号	对照组			DDH 组		
	TGF- β_2	β -actin	TGF- β_2/β -actin	TGF- β_2	β -actin	TGF- β_2/β -actin
1	59 586	46 569	1.28	19 804	113 177	0.175
2	16 101	52 236	0.308	6 325	26 588	0.238
3	10 753	25 230	0.426	3 233	78 974	0.041
4	31 236	74 893	0.417	2 584	15 697	0.165
5	14 735	18 666	0.789	14 607	70 690	0.207
6	15 176	75 276	0.202	3 696	111 199	0.033
7	25 259	156 947	0.161	37 938	241 246	0.157
8	14 786	17 373	0.851	41 033	74 702	0.549

注: 两组的 TGF- β_2 mRNA 表达差异比较 (TGF- β_2/β -actin), *t* = 2.88, *P* < 0.05

3 讨论

转化生长因子 β (TGF- β) 家族是一组调节细胞生长和分化的蛋白质家族, 其家族成员至少包括 25 个, 除 TGF- β 外, 还包括活化素、抑制素、缓勒氏管抑制物 (MIS), 骨形成蛋白 (BMP) 等。TGF- β 主要由巨核细胞合成, 较高浓度储存在血小板 α 颗粒中。TGF- β 是一种多效细胞因子, 具有广泛的生物学功能, 它能促进成纤维细胞的分裂、增殖, 并通过调控细胞外基质影响生成细胞的转录或转录后水平, 作用于胶原的转录和翻译过程, 诱导前胶原 mRNA 的产生, 从而提高编码纤维结合素 (FN)^[3]、胶原蛋白 I、III、IV 基因的表达, 因此能调节细胞外

基质蛋白的合成。它也能减少类似胶原酶的各种酶(如金属蛋白酶)的合成,减低了细胞外基质蛋白的降解,同时还能刺激蛋白酶抑制剂的合成。而这些作用的最终结果是增加细胞外基质蛋白的生成和积聚,有利于损伤修复,但是当 TGF- β 持续过度表达时就会导致各种纤维化疾病(如骨髓纤维化、肝纤维化或肾纤维化等)^[4-5],这些与其促进成纤维细胞合成、分裂、增殖关系密切。

1985年 TGF- β 的目的基因克隆成功,目前认为 TGF- β 包括 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 及 TGF- β_4 4个亚型。TGF- β 是由两个结构相同或相似分子量为 12.5 KD 的亚单位借助分子间的二硫键连接而成的双体。不同亚型 TGF- β 的分泌及功能特点均为细胞类型专一。TGF- β 介导许多细胞外基质,如胶原蛋白、纤维结合素、层粘连蛋白、细胞粘附素等的合成,并具有抑制基质降解酶活性的作用,因此其在创伤愈合、纤维症、胚胎发育、肿瘤发生中起重要作用^[6]。TGF- β 通过 Smad/p300、Ap1 和 Sp1 等多种途径调节 COL1A2 基因^[7],从而影响 I 型胶原蛋白的表达,增强成纤维细胞 I 型胶原的合成能力。关节囊及圆韧带中主要的细胞成分为 I 型成纤维细胞,其具有强大的胶原合成功能,胶原分子在成纤维细胞外通过共价键相互交联形成胶原纤维,具有一定的抗张能力以保持关节囊及韧带的生理功能。目前所知 TGF- β 家族具有增强成纤维细胞 I 型胶原合成能力,它通过与 Biglycan 核心蛋白粘结,再与成纤维细胞作用而增强胶原合成^[2,8-9]。本研究发现不论是在 DDH 组,还是对照组,分泌 TGF- β_2 的成纤维细胞在贴近关节侧的滑膜层都明显多于关节囊深层,富集于关节囊关节面,与关节囊纤维走向平行分布。内部纤维层阳性表达成份稀疏,强度明显减弱。两组比较,DDH 组关节囊有阳性表现的成纤维细胞数的比率明显少于对照组,并且其关节囊染色局部的灰度值也低于对照组,提示 DDH 组关节囊中 TGF- β_2 的局部分布明显较少,TGF- β_2 的局部作用减弱;进一步 RT-PCR 分析可见 DDH 组关节囊组织中 TGF- β_2 mRNA 表达水平明显低于对照组,提示 DDH 组关节囊中 TGF- β_2 的减少可能与转录水平降低有关。其含量下降可致 TGF- β_2 的促粘合作用减弱,亦就妨碍了 TGF- β 促 I 型胶原合成的能力,同

时不能有效防止胶原蛋白降解,从而致胶原纤维薄弱,出现关节囊及韧带松弛而引起髋关节脱位。

目前髋关节松弛是导致髋脱位主要因素之一已得到了普遍认同,以往的研究发现髋脱位患儿多伴有关节松弛^[10-11],这与髋脱位术中所见松弛薄弱的关节囊相符。本研究发现髋脱位患儿髋关节囊中 TGF- β_2 的局部分布和 mRNA 水平表达均有明显下降,很有可能与胶原蛋白合成减少、胶原蛋白降解增多有关,从而导致髋关节囊与圆韧带松弛薄弱、关节松弛和髋关节脱位。总而言之,关节囊中 TGF- β_2 的分布减少、含量降低和表达异常,很可能是 DDH 患儿关节松弛,进而导致髋关节脱位的原因之一。

[参 考 文 献]

- [1] Olshan AF, Schroeder JC, Alderman BW, Mosca VS. Joint laxity and the risk of clubfoot [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2003, 67(8):585-590.
- [2] 王恩波,赵群,李连永,史立伟,高红. COL1a1 COL3a1 在发育性髋关节脱位患儿关节囊的表达 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(4):493-496.
- [3] Bochaton-Piallat ML, Kaapetaoios AD, Donati G, Redard M, Gabiani G, Pournaras CJ. TGF- β_1 , TGF- β receptor II and EDA fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(8):2336-2342.
- [4] 董祥林,马少林. 转化生长因子 β 在纤维化疾病中的研究与应用 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(35):8050-8051.
- [5] 高中玉,林子豪,袁相斌. TGF- β 基因表达调控的新进展 [J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(3):253-256.
- [6] Globe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor- β in human diseases [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18):1350-1358.
- [7] Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Varga J. Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF- β involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators [J]. *Oncogene*, 2000, 19(31):3546-3555.
- [8] Lechner BE, Lim JH, Mercado ML, Fallon JR. Developmental regulation of biglycan expression in muscle and tendon [J]. *Muscle Nerve*, 2006, 34(3):347-355.
- [9] Kresse H, Schonherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189(3):266-274.
- [10] Oda H, Igarashi M, Hayashi Y, Karube S, Inoue S, Sakaguchi R, et al. Soft tissue collagen in congenital dislocation of the hip. Biochemical studies of the ligamentum teres of the femur and the hip joint capsule [J]. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 1984, 58(3):331-338.
- [11] 史立伟,赵群,张立军,李祁伟,李连永. 发育性髋关节发育不良与关节松弛的相关性研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(13):973-976.

(本文编辑:黄 榕)