

· 临床研究 ·

COL1a1 COL3a1 在发育性髋脱位患儿关节囊的表达

王恩波¹,赵群¹,李连永¹,史立伟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 发育性髋脱位(developmental dislocation of the hip, DDH)的病因目前不明,但其与髋关节松弛密切相关。该研究通过比较 DDH 患儿与正常儿童关节囊中 I,Ⅲ型胶原在 mRNA 及蛋白水平的表达差异,以探索 DDH 患儿髋关节松弛的原因。方法 选取性别相同年龄相近的 9 对发育性髋脱位患者及正常儿童配对比较。采用半定量 RT-PCR 及 Western-Blot 法检测 COL1a1 COL3a1 在 mRNA 及蛋白水平的表达。图像分析软件进行量化分析,并经统计学处理。结果 COL1a1 在 DDH 组 mRNA 及蛋白水平表达均较正常对照组降低($P<0.01$);COL3a1 在 DDH 组 mRNA 水平表达较正常对照组降低($P<0.01$),其蛋白水平表达与正常对照组无显著差异($P>0.05$)。结论 DDH 患儿关节囊中 I 型胶原在 mRNA 及蛋白水平表达较正常同性同龄儿降低,可能是导致 DDH 患儿髋关节松弛的原因。DDH 患儿髋关节松弛可能与Ⅲ型胶原含量无关。 [中国当代儿科杂志,2008,10(4):493-496]

[关键词] 发育性髋脱位;关节松弛;关节囊;胶原;儿童

[中图分类号] R684.7 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)04-0493-04

Expression of COL1a1 and COL3a1 in the capsule of children with developmental dislocation of the hip

WANG En-Bo, ZHAO Qun, LI Lian-Yong, SHI Li-Wei, GAO Hong. Department of Pediatric Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Zhao Q, Email:websyy@ tom. com)

Abstract: Objective The etiology of developmental dislocation of the hip (DDH) remains uncertain, but some research has shown that this disorder is closely related to hip joint laxity. This study examined the expression of collagens type I and III mRNA and protein in the hip capsule of children with DDH in order to investigate the roles of collagens type I and III in hip joint laxity. **Methods** Nine children with DDH and nine age and gender-matched normal children (control group) were enrolled. Semiquantitative RT-PCR method was used to detect mRNA expression of COL1a1 and COL3a1 in the hip capsule. Western-Blot method was used to detect protein expression of COL1a1 and COL3a1 in the hip capsule. The quantitative analysis of the COL1a1 and COL3a1 was performed by professional image software and the results were analyzed with standard statistical methods. **Results** mRNA and protein expression of COL1a1 in the DDH group was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). Compared with the control group, COL1a3 mRNA expression in the DDH group decreased significantly ($P<0.01$), but COL1a3 protein expression was not significantly different. **Conclusions** The decreased collagen I mRNA and protein expression in the hip capsule might contribute to hip joint laxity in children with DDH. Collagen type III may not be associated with hip joint laxity in DDH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (4):493-496]

Key words: Developmental dislocation of the hip; Joint laxity; Capsule; Collagen; Child

关节囊与韧带松弛是导致发育性髋脱位(developmental dislocation of the hip, DDH)的主要因素之一^[1]。胶原纤维是构成关节囊中细胞外基质的主要成分,并使其保持一定的强度和韧性。各型胶原结构和(或)含量的变化可能会导致其拉伸增强作用下降,发生关节松弛^[2]。目前关于 DDH 关节囊内胶原蛋白的研究国内外报道较少。本研究应用

分子生物学检测技术比较 I,Ⅲ型胶原在转录水平和蛋白水平的表达差异。

1 材料和方法

1.1 标本来源及制备

DDH 组髋关节囊标本 9 例,均无家族史,不合

[收稿日期]2007-11-16;[修回日期]2007-12-24
[基金资助]国家自然科学基金(项目批准号:30600654)
[作者简介]王恩波,男,博士,副教授。主攻方向:小儿骨骼肌肉系统畸形。
[通讯作者]赵群,教授,中国医科大学附属盛京医院小儿外科,邮编:110004。

并其他畸形。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。与 DDH 组性别相同年龄相近(<6 月)正常儿童髋关节囊标本 9 例,来源方式:1 例来源外伤性髋脱位,6 例来源于股骨颈骨折及不影响胶原代谢的良性骨肿瘤手术,2 例来源非脑源性意外死亡后尸检(死亡 3 h 内尸检)。取材部位及方法同 DDH 组。剪取全层厚关节囊组织小块深低温保存。

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 半定量 RT-PCR

1.2.1 组织总 RNA 提取 关节囊组织总 RNA 提取按照 Invitrogen 公司(美国)提取试剂盒说明书进行。紫外分光光度计检测 RNA 纯度及浓度,纯度为 1.69 ~ 1.94。

1.2.2 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 2 μ L, 2 $\times$ Buffer 10 μ L; 25 mmol MgSO₄ 4 μ L; 10 mmol dNTPs 1 μ L; 22 U/ μ L AMV 1 μ L; 50 μ molOligo-dT 1 μ L ; 40 U/ μ L RNase Inhibitor 0.5 μ L; ddH₂O 0.5 μ L。混匀后置于下列温度反应:65 $^{\circ}$ C 1 min, 30 $^{\circ}$ C 5 min, 于 30 min 匀速升温至 65 $^{\circ}$ C , 65 $^{\circ}$ C 30 min, 98 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.3 聚合酶链反应 在 25 μ L 反应体系中,分别加入:DNA; ddH₂O; PCR buffer(10 $\times$); dNTPs(各 2.5 mM); Taq DNA 聚合酶(5 u/ μ L);待测指标的上游引物和下游引物(Invitrogen, 上海);引物终浓度为 5-20 pmol。各指标及内参 GAPDH 引物的序列、扩增条件见表 1。

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)	Genebank	循环条件
COL1a1				94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s
上游	5'-AACATAATCCGCAGTGGCCT-3'	509	BC036531	65 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min
下游	5'-CTCCTGTTGCGTTGCTCCTT-3'			35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 7 min
COL3a1				94 $^{\circ}$ C 3 min, 90 $^{\circ}$ C 30 s
上游	5'-CCCAGAACATCACATATCAC-3'	366	NM000090	58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min
下游	5'-CAAGAGGAACACATATGGAG-3'			35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 7 min
GAPDH				95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s
上游	5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	307	XR018317	60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min
下游	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'			40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 7 min

1.2.4 PCR 产物电泳及检测 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, 1Dkodar 成像系统成像,应用 Scion Image 软件对条带灰度进行半定量分析。

1.3 Western-blot

胶原标本制备:标本称重,在酸性条件下(0.5 M 乙酸, pH 2.5)以 10% 胃蛋白酶消化 22 h。-4 $^{\circ}$ C 19 000 r/min 离心 1 h, 2 M NaCl 加入上清, -4 $^{\circ}$ C 19 000 r/min 离心 1 h, 上清即为可溶胶原。蛋白定量:按酚试剂法测定并调平蛋白质浓度。变性:加入 2% β -巯基乙醇 100 $^{\circ}$ C 变性 1 min。电泳:取 20 μ L 蛋白上样,经 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳 2 h,电压 130 v。转膜:将 PAGE 凝胶中的蛋白通过电转移槽转移至硝酸纤维素膜上, 2 h, 电压 40 v。封闭:TBS 洗膜 1 次,加入含 8% BSA 的 TTBS 4 $^{\circ}$ C 过夜。一抗孵育:TBS 洗膜 3 次,每次 5 min,分别加入山羊抗人、兔抗人多克隆抗体(1 : 1 000),室温下 2 h。二抗孵育:加入碱性磷酸酶标记的二抗(1:200),室温 4 h。显色:以碱性磷酸酶

染色液染色。结果分析:用自动电泳凝胶成像系统采集图像,应用 Scion Image 软件对免疫印迹条带进行半定量分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件(10.0 版本,美国)进行统计学分析,数据资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 视为统计学上显著差异。配对比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR

DDH 组小儿关节囊 COL1a1、COL3a1 mRNA 的表达较对照组降低($P < 0.01$,表 2)。

2.2 Western blot

DDH 组小儿关节囊 COL1a1 的蛋白表达较对照组降低($P < 0.01$),COL3a1 的蛋白表达与对照组差异无显著性(表 3)。

表 2 9 对 DDH 组与对照组小儿关节囊 COL1a1, COL3a1 mRNA 的表达

编号	性别	DDH 组			对照组		
		年龄(岁)	COL1a1/GAPDH ^a	COL3a1/GAPDH ^a	年龄(岁)	COL1a1/GAPDH	COL3a1/GAPDH
1	女	1.0	0.85	0.74	0.8	1.94	0.85
2	男	3.1	0.46	0.92	2.6	1.19	0.97
3	男	5.0	0.51	0.74	5.0	0.73	0.78
4	女	7.0	0.45	0.83	6.8	0.66	0.95
5	女	8.0	0.62	0.74	8.0	1.38	0.79
6	女	8.5	0.60	0.71	8.8	1.10	0.87
7	女	10.3	0.50	0.74	10.8	1.33	0.86
8	女	11.7	0.49	0.78	11.5	0.90	0.80
9	女	12.5	0.50	0.68	13.0	0.80	0.75

a: 配对 *t* 检验, 均 *P* < 0.01

表 3 9 对 DDH 组与对照组小儿关节囊 COL1a1 和 COL3a1 的蛋白表达差异

编号	性别	DDH 组				对照组			
		年龄(岁)	COL1a1 ^a	COL3a1	β-actin	年龄(岁)	COL1a1	COL3a1	β-actin
1	女	1.0	138.1 ± 9.2	117.4 ± 10.9	142.1 ± 2.0	0.8	179.9 ± 11.1	77.3 ± 7.6	141.0 ± 0.6
2	男	3.1	149.4 ± 10.0	104.9 ± 8.6	138.6 ± 2.6	2.6	196.9 ± 10.2	118.2 ± 14.1	154.2 ± 2.3
3	男	5.0	112.1 ± 10.1	129.0 ± 11.8	143.4 ± 1.7	5.0	150.7 ± 8.2	114.3 ± 8.2	159.1 ± 1.4
4	女	7.0	158.7 ± 6.0	112.3 ± 9.4	153.0 ± 1.5	6.8	170.4 ± 11.6	121.0 ± 22.5	144.8 ± 1.9
5	女	8.0	143.3 ± 7.0	98.8 ± 13.9	152.3 ± 7.6	8.0	172.3 ± 6.1	125.4 ± 21.1	168.0 ± 6.0
6	女	8.5	144.7 ± 2.5	97.1 ± 13.6	170.2 ± 30.6	8.8	208.0 ± 3.5	139.6 ± 11.8	162.9 ± 21.9
7	女	10.3	139.4 ± 9.7	108.4 ± 15.2	160.8 ± 23.3	10.8	201.3 ± 5.6	149.9 ± 11.5	172.5 ± 29.5
8	女	11.7	147.2 ± 2.9	103.6 ± 14.7	166.3 ± 30.1	11.5	160.2 ± 4.1	129.8 ± 10.8	163.2 ± 27.3
9	女	12.5	150.2 ± 3.6	97.3 ± 13.6	175.7 ± 29.6	13.0	165.9 ± 4.2	125.9 ± 11.4	157.0 ± 32.0

a: 配对 *t* 检验, *P* < 0.01

3 讨论

以往的研究发现髋脱位患儿多伴有关节松弛^[1,2],这与髋脱位术中所见松弛薄弱的关节囊与圆韧带相符。因此髋关节松弛是导致髋脱位主要因素之一也得到了普遍认同^[3,4]。但作为杓臼关节的髋关节要保持稳定,主要依靠骨的形态,而关节囊及圆韧带则能保持它们固定于正常的位置。人类出生时髋臼较浅,股骨头表面为平滑弧线,出生后髋臼不断加深,股骨头弧度加大,髋关节逐渐稳定,而这需要头臼同心的相互作用才能达到。而关节囊和圆韧带则具有保持这种头臼同心位置重要的作用。

构成关节囊并发挥抗生物张力生理功能的主要成分是胶原纤维。胶原是人体中最为丰富,分布最为广泛的一组糖蛋白分子,约占人体蛋白总量的 30%^[5]。依据胶原分子结构特点分为两大类^[6]:即经典的纤维形成胶原和非纤维形成胶原。Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ型是最为经典纤维形成胶原,这三种胶原约占体内总胶原的 80% ~ 90%,因此也成为研究的重点^[7]。胶原分子主要由成纤维细胞、成骨细胞等合成、分泌。具有三螺旋结构的胶原分子被转运至细胞外通

过共价键相互交联形成胶原纤维^[8]。关节囊主要由Ⅰ,Ⅲ型胶原参与构建^[9]。

Bland^[10]观察了从 17 d 胎兔至 2 岁成年兔髋关节囊中胶原的分布及演变规律。25 d 胎兔可肉眼分辨髋关节囊,其以Ⅰ型胶原为主导遍布整个关节囊,而Ⅲ,Ⅴ型胶原则在其中形成网状结构,直到出生、成年。Ⅰ型胶原成束状大量分布,具有强大的抗张能力。Ⅲ型胶原成网格样分布,可保持组织器官形态结构,到目前为止,Ⅰ,Ⅲ型胶原成为关节囊胶原研究的重点。成纤维细胞是关节囊的主要细胞成分,具有强大的胶原分泌功能。先前的 DDH 关节囊免疫组化研究中发现^[11],有阳性表现的成纤维细胞数与年龄呈负相关,即年龄越小百分比越大,合成能力越强,随着年龄增大,合成能力降低。这与 mRNA 表达结果相符,即成纤维细胞Ⅰ型胶原 mRNA 表达量降低。RT-PCR 的结果显示 DDH 组关节囊成纤维细胞Ⅲ型胶原 mRNA 表达量亦降低,表明 DDH 组关节囊成纤维细胞在Ⅰ,Ⅲ型胶原转录水平的降低。目前为止关于 DDH 关节囊中胶原 mRNA 水平的变化未见相关报道。

关节过度活动系由关节囊及韧带松弛而来,有许多学者^[3]推测它很可能与某些细胞外基质成分

有关,如胶原、弹力纤维等。关于 DDH 关节囊中胶原纤维蛋白水平的研究,以前曾有过少量结果迥异的报道:1980 年 Ippilito^[12]通过对 12 例 2 月龄至 4 岁 DDH 患儿关节囊及圆韧带的组织学及超微结构研究发现:成纤维细胞形态各异,分布杂乱;胶原纤维束增粗,厚度不均,胶原纤维整体较正常儿薄弱。1984 年 Skirving^[13]应用生物化学方法发现 1~4 岁 DDH 患儿关节囊中Ⅲ型胶原相对于Ⅰ型胶原所占比例减少,而 Jensen^[14]却发现患有 DDH 新生儿脐带内Ⅲ型胶原较正常增多。本研究采用 Western blot 蛋白定量的方法,对关节囊Ⅰ、Ⅲ型胶原进行研究,发现在 DDH 组关节囊中Ⅰ型胶原较正常组减少,而Ⅲ型胶原与正常组无明显差异。Ⅰ型胶原主要的生理功能为抵抗生物张力^[5],它的含量减少可能会导致抗张能力下降,关节松弛乃至脱位的发生。

综上所述,DDH 患儿关节囊中Ⅰ型胶原在 mRNA 水平及蛋白水平表达的下降可能是导致关节松弛、进而脱位的主要原因。分析其原因可能有:①激素影响。体内实验中早在 1976 年 Hama 等^[15]发现卵巢切除大鼠髋关节囊的胶原含量及直径明显增加,应用雌激素后再明显减小,说明了雌激素对胶原合成的抑制作用。出生后虽然雌激素水平明显降低,但靶器官的高敏感性亦会使其受到激素影响,膝关节前交叉韧带中已被证实雌激素受体的存在^[16],同时交叉韧带内成纤维细胞的体外培养也证实培养液雌激素浓度与成纤维细胞增值和Ⅰ型前胶原合成量成反比,而对Ⅲ型前胶原合成无明显影响^[17,18]。髋关节囊成纤维细胞内是否存在雌激素受体,胎儿在宫内高雌激素环境下胶原代谢是否受到上述影响目前未见相关报道,值得进一步探索。②合成与分解^[8,9]。转化生长因子 TGF-β 和(或)胰岛素样生长因子 IGF 家族成员会促进成纤维细胞Ⅰ型胶原的合成。金属蛋白酶(MMP)直接参与胶原的降解。另外一些小分子蛋白多糖(biglycan, decorin, fibulin)也对胶原合成及粘集起重要作用^[19]。目前尚不知上述物质在 DDH 中对关节囊与圆韧带胶原代谢的影响。③异常生物力学的影响。宫内拥挤,臀先露胎位,髋关节脱位后的负重行走等都会对圆韧带产生异常生物力学刺激,并可能由此转化为生物化学信号而影响胶原代谢。本研究尚不能区分胶原代谢异常与 DDH 的髋关节异常生物力学孰为因果,有待于进一步深入。

[参 考 文 献]

[1] Fredensborg N, Uden A. Altered connective tissue in children

with congenital dislocation of the hip[J]. Arch Dis Child, 1976, 51(11):887-889.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Steheli LT. Practice of pediatric orthopedics[M]. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006,173-180.

[5] Wess TJ. Collagen fibril form and function[J]. Adv Protein Chem, 2005,70:341-374.

[6] Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix[J]. Adv Protein Chem, 2005,70:301-339.

[7] Hulmes DJS. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures[J]. J Struct Biol, 2002,137(1-2):2-10.

[8] Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 7): 1341-1353.

[9] Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review[J]. Clin Orthop Relat Res, 1995, (318):265-278.

[10] Bland YS, Ashhurst DE. Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing[J]. Histochem J, 1996,28(4): 265-274.

[11] 王恩波,赵群. 发育性髋脱位髋关节囊中Ⅰ、Ⅲ型胶原的免疫组化研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2007, 28(5):250-253.

[12] Ippilito E, Ishii Y, Ponseti IV. Histologic, histochemical, and ultrastructural studies of the hip joint capsule and ligamentum teres in congenital dislocation of the hip[J]. Clin Orthop Relat Res, 1980, (146):246-258.

[13] Skirving AP, Sims TJ, Bailey AJ. Congenital dislocation of the hip: a possible inborn error of collagen metabolism[J]. J Inherit Metab Dis, 1984,7(1):27-31.

[14] Jensen BA, Reimann I, Fredensborg N. Collagen type III predominance in newborns with congenital dislocation of the hip[J]. Acta Orthop Scand, 1986,57(4):362-365.

[15] Hama H, Yamamuro T, Takeda T. Experimental studies on connective tissue of the capsular ligament. Influences of aging and sex hormones[J]. Acta Orthop Scand,1976,47(5):473-479.

[16] Liu SH, al-Shaikh R, Panossian V, Yang RS, Nelson SD, Soileman N, et al. Primary immunolocalization of estrogen and progesterone target cells in the human anterior cruciate ligament[J]. J Orthop Res,1996,14(4): 526-533.

[17] Yu WD, Panossian V, Hatch JD, Liu SH, Finerman GA. Combined effects of estrogen and progesterone on the anterior cruciate ligament[J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, (383):268-281.

[18] Seneviratne A, Attia E, Williams RJ, Rodeo SA, Hannafin JA. The effect of estrogen on ovine anterior ligament fibroblast: cell proliferation and collagen synthesis[J]. Am J Sports Med, 2004, 32(7):1613-1618.

[19] Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan[J]. Biomacromolecules, 2006,7(8): 2388-2393.

(本文编辑:吉耕中)