论著·临床研究

COL9A1 基因在单纯性马蹄内翻足中的表达及其多态性分析

刘丽英[1] 金春莲[2] 蒋丽[1] 林长坤[2]

(1. 中国医科大学遗传学教研室,辽宁 沈阳 110001;
2. 沈阳市妇婴医院生殖中心,辽宁 沈阳 110014)

[**摘 要**] **目的** *COL9A1* 基因是位于单纯性马蹄内翻足(ICTEV)易感区域(6q12-13)的已知基因。本研究探讨 *COL9A1* 基因在 ICTEV 患者中的表达及其单核苷酸多态(SNP)位点在 ICTEV 和正常人中的分布情况。**方法** 应用免疫组化方法检测 25 例 ICTEV 患儿及 5 例正常对照组肌肉及肌腱组织中 COL9A1 的表达;应用限制性片段长度多态性技术结合测序法,分析 118 例 ICTEV 患者及 100 名正常人 *COL9A1* 基因的 2 个 SNP 位点基因型。**结果** 88%(22/25)的 ICTEV 患者 COL9A1 蛋白表达阳性,明显高于正常对照组。位于 *COL9A1* 基因编码区的 SNP 位点 rs1135056 的基因型频率和等位基因频率在两组人群中的分布差异有统计学意义($P<0.05$):ICTEV 组 G 等位基因频率高于对照组;与对照组相比,AA 基因型频率降低,AG、GG 基因型频率增高。**结论** *COL9A1* 基因在 ICTEV 中高表达,rs1135056 多态位点 G 等位基因和 ICTEV 的发生相关。

[**中国当代儿科杂志,2011,13(6):478-481**]

[**关 键 词**] 单纯性马蹄内翻足; *COL9A1* 基因; 单核苷酸多态; 儿童
[**中图分类号**] R596 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1008-8830(2011)06-0478-04

Expression of *COL9A1* gene and its polymorphism in children with idiopathic congenital talipes equinovarus

LIU Li-Ying, JIN Chun-Lian, JIANG Li, LIN Chang-Kun. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, *China* (*Jin C-L, Email: chunlianjin@126.com*)

Abstract: Objective *COL9A1* gene is located in the susceptibility region of idiopathic congenital talipes equinovarus (ICTEV) (6q12-13). This study aimed to investigate the expression of the *COL9A1* gene and the distribution of single nucleotide polymorphism (SNP) of *COL9A1* gene in patients with ICTEV and normal controls. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of COL9A1 in 25 children with ICTEV and 5 normal controls. The frequencies of genotypes and allele of two SNPs in *COL9A1* gene rs35470562 and rs1135056 were investigated by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing in 118 patients with ICTEV and 100 normal controls. **Results** The COL9A1 protein expression was significantly higher in 22 (88%) out of 25 children with ICTEV than normal controls. There were significant differences in the frequencies of genotypes and allele of rs1135056 in *COL9A1* gene between the ICTEV and the control groups: the G allele frequency was higher, the frequency of AA genotype was lower, and the frequencies of AG and GG genotypes were higher in ICTEV patients than those in healthy controls ($P<0.05$). **Conclusions** COL9A1 protein is highly expressed in patients with ICTEV and rs1135056, which is located in the coding region of *COL9A1* gene, may be associated with the pathogenesis of ICTEV.

[**Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (6): 478-481**]

Key words: Idiopathic congenital talipes equinovarus; *COL9A1* gene; Single nucleotide polymorphism; Child

单纯性马蹄内翻足(idiopathic congenital talipes equinovarus, ICTEV)是一种较常见的影响足功能的先天畸形,表现为足前端内收,踝跖屈,跟骨内翻,胫骨远侧内旋等改变[1]。近年来国内外对于 ICTEV 病因、病理及发病机制的研究争论较多,包括骨骼发育异常、神经肌肉病变、软组织挛缩、血管异常等等,

[收稿日期]2010-09-03;[修回日期]2010-12-21
[基金项目]国家重点基础研究发展规划 973 项目(2001CB510301);国家自然科学基金项目(30471803)。
[作者简介]刘丽英,女,博士,主治医师。
[通信作者]金春莲,教授。

但均缺乏有力的证据[2]。双生子研究、复合分离分析均证明遗传因素在 ICTEV 的发生中起重要作用，但其遗传方式、外显率等均不清楚，易感基因尚未确定[3]。

本课题组前期应用传递不平衡检验首次将 ICTEV 易感基因初步定位于 6q12-13 区域，*COL9A1* 基因是位于该区域的已知基因，主要表达于软骨组织，对关节软骨内环境的稳定具有重要的作用。为探讨 *COL9A1* 基因与 ICTEV 的分子遗传学联系，本研究就 COL9A1 蛋白在 ICTEV 患儿足部肌肉及肌腱组织中的表达及 *COL9A1* 基因内的 2 个已知单核苷酸多态（single nucleotide polymorphism，SNP）进行研究，检测其在 ICTEV 患儿及正常人中的分布，分析其与 ICTEV 遗传易感性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

118 名中国医科大学附属第二临床学院小儿骨外科经 X 线和手术确诊的 ICTEV 患儿（年龄 4 月～15 岁）；对照组为 100 名中国医科大学附属第二临床学院体检的健康人（年龄 12～50 岁）。抽取所有 ICTEV 患者和对照组静脉血 5 mL，枸橼酸钠抗凝后 −20℃ 冻存，备用。

25 例 ICTEV 患儿（8 个月～15 岁）的足部肌肉及肌腱标本，5 例（外伤、足月引产胎儿各 2 例，尸检 1 例）对照的肌肉及肌腱组织标本置于液氮中冻存后，−70℃ 贮存备用。本研究获得患者及家属书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测肌肉及肌腱 COL9A1 表达　石蜡包埋的组织切片固定，脱蜡。微波修复抗原后置室温自然冷却 20 min，PBS 冲洗 3 次，每次 3～5 min；3% 的 H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶，反应 15 min后用正常山羊血清封闭，室温孵育 10 min；兔抗人多克隆 COL9A1 原抗体（1∶200）室温孵育 1 h，PBS 冲洗 3 次，每次 3～5 min；滴加第二代生物素标记的抗兔二抗工作液，室温孵育 20 min，PBS 冲洗 3 次，每次 3～5 min；滴加第二代辣根酶标记的链酶卵白素工作液，孵育冲洗过程同上；DAB 显色，复染细胞核，封固。光镜下观察，细胞外基质中出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。根据染色的强弱及面积判定：阳性部分 < 10% 者为阴性（−）；11%～25% 者为弱阳性（+）；26%～50% 者为阳性（++）；>50% 为强阳性（+++）。

1.2.2 基因组 DNA 提取　应用常规饱和酚－氯仿法提取基因组 DNA[4]。

1.2.3 SNP 的选取及引物设计　从 SNP 数据库中检索 *COL9A1* 基因编码区 SNP（cSNP），选择 2 个可引起氨基酸改变的 cSNP rs1135056、rs35470562，应用 Primer 5.0 软件设计引物。cSNP 等位基因、引物序列、扩增长度等见表 1。

表 1 cSNP 的一般信息

cSNP	等位基因	引物序列	长度（bp）	酶切后片断（bp）
rs1135056	A/G	CTAGCATGGGCTCAAACA	287	160/127
		CCTGGTCAGATGGGAAAT		（*Sma* I）
rs35470562	G/A	ACTGTGGGCACTTATGAA	341	113/228
		GCAATCTTGGGAGACTTT		（*Mbo* II）

1.2.4 PCR 扩增体系及条件　反应液总体积 25 μL：基因组 DNA 约 40 ng，10 × 反应缓冲液（$MgCl_2$ 15 mmol/L）2.5 μL，dNTP（2.0 mmol/L）2.0 μL，上下引物（20 μmmol/L）各 0.5 μL，*Taq* 酶 1 U。循环参数：①rs1135056：94℃ 预变性 3 min，94℃ 变性 50 s，54℃ 复性 50 s，72 ℃ 延伸 50 s，35 个循环，最后 72 ℃ 延伸 5 min。② rs35470562：94℃ 预变性 3 min，94℃ 变性 50 s，51℃ 复性 40 s，72℃ 延伸 50 s，35 个循环，最后 72℃ 延伸 10 min。所有 PCR 产物均经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测确认。

1.2.5 限制性内切酶鉴定基因型　*Sma I* 酶切鉴定 rs1135056 基因型。酶切反应体系 20 μL：其中 PCR 产物 8 μL、*Sma I* 5 U、10 × 缓冲液 2.0 μL，30℃ 水浴过夜，1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型。*Mbo* II 酶切鉴定 rs35470562 基因型。酶切反应体系 20 μL：其中 PCR 产物 8 μL、*Mbo* II 5 U、10 × 缓冲液 2.0 μL，37℃ 水浴过夜，1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型。

1.3 统计学分析

应用在线检测程序检测 ICTEV 组与对照组的 Hardy-Weinberg 平衡；应用 χ^2 检验统计分析 ICTEV 组和对照组基因型频率及等位基因频率。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COL9A1 蛋白免疫组化结果

免疫组化结果显示，COL9A1 蛋白表达于正常及 ICTEV 患儿软骨组织、肌肉及肌腱组织的细胞外基质，染色呈淡黄色或棕黄色。25 例 ICTEV 患儿

标本中 22 例(88%)COL9A1 蛋白表达阳性,其中 8 例(36%)表达为(++),14 例(64%)表达为(+++)。5 例对照组中 2 例 COL9A1 蛋白表达阳性,占 20%,无强阳性者。见图 1。

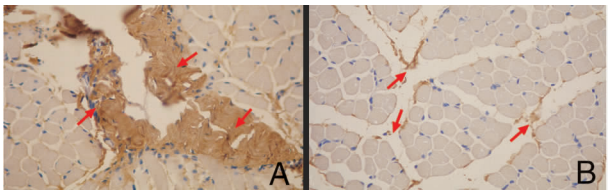

图 1　COL9A1 在肌肉及肌腱组织中的表达(免疫组化,×400)　**A**:COL9A1 在 ICTEV 患儿的表达;**B**:COL9A1在对照组的表达。COL9A1 表达于细胞外基质中,红色箭头所示为 COL9A1 阳性染色部位。

2.2　rs1135056 及 rs35470562 酶切鉴定结果

rs35470562 经酶切鉴定未检测到多态性;rs1135056 位点存在多态性。见图 2。测序结果见图 3~5。

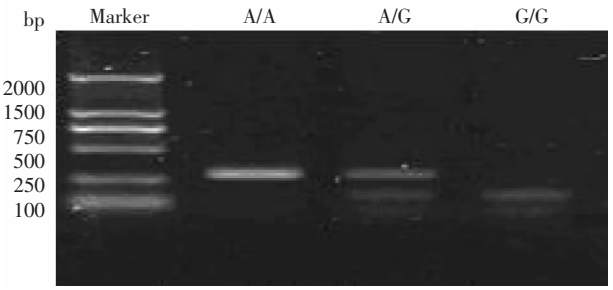

图 2　rs1135056 位点的 PCR-RFLP 结果　A/A 基因型经酶切后出现 287 bp 一条带;A/G 基因型经酶切后出现 287 bp、160 bp、127 bp 三条带;G/G 基因型经酶切后出现 160 bp、127 bp 两条带。

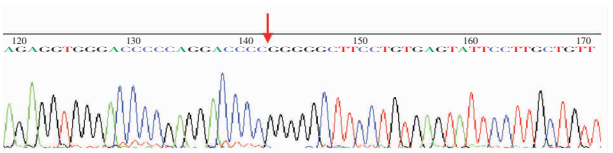

图 3　rs1135056 纯合子 GG 测序图　142 位碱基为 G。

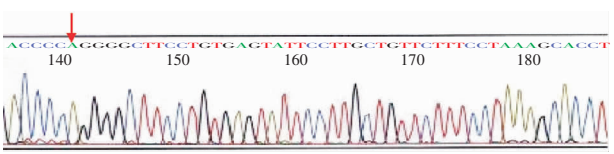

图 4　rs1135056 纯合子 AA 测序图　141 位碱基为 A。

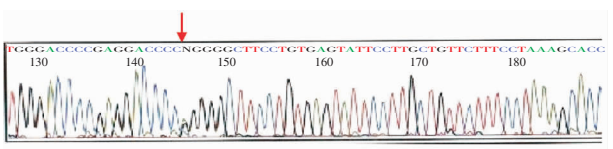

图 5　rs1135056 杂合子 AG 测序图　145 位碱基为 N。

2.3　ICTEV 组与对照组 rs1135056 位点基因型频率和等位基因频率比较

ICTEV 组和对照组基因型频率分布、等位基因频率分布差异有统计学意义(χ^2 = 8.88 和 5.5,P < 0.05),其中 ICTEV 组 G 等位基因频率高于对照组;与对照组相比,AA 基因型频率降低,AG、GG 基因型频率增高。

表 2　对照组与 ICTEV 组 rs1135056 位点基因型频率和等位基因频率比较　[例(%)]

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
对照组	100	48(48.0)	33(33.0)	19(19.0)	129(64.5)	71(35.5)
ICTEV 组	118	34(28.8)	58(49.2)	26(22.0)	126(53.4)	110(46.6)

3　讨论

ICTEV 的病因及发病机制学说较多,主要与骨骼发育异常、神经肌肉病变、软组织挛缩、血管异常、宫内发育阻滞、母亲吸烟及受孕月份、出生季节等有关,但均缺乏有力的证据[2]。本课题组前期将单纯性 ICTEV 易感基因定位至 6q 12-13 区域,在此候选区域内存在的已知基因主要有 *COL9A1*、*PGM3*、*BAI3*、*COL19A1* 及 *COL12A1* 等,其中 *COL9A1* 基因是位于此区域重要的候选基因。*COL9A1* 基因是 Kimura 等[5]1989 年克隆的,Warman 等[6]1993 年通过荧光原位杂交方法将其定位于 6q12-q13,该基因由于转录起始点的不同有两个转录本,cDNA 全长分别为 3704 bp 和 2985 bp,分别有 38 和 32 个外显子[7]。组成 IX 型胶原的 α_1 链,是透明软骨中的主要胶原成份。研究表明 α_1 链、α_2 及 α_3 异源三聚体聚集形成 IX 型胶原过程中,*COL9A1* 基因编码的 α1 链起很重要的作用。IX 型胶原可以结合基质金属蛋白酶组织抑制剂、生长因子及软骨细胞膜的表面受体,对关节软骨内环境的稳定以及保护关节软骨具有重要的作用。目前的研究表明,IX 型胶原基因突变可以引起轻度的软骨发育不良[8],同时有报道表明 *COL9A1* 基因第 9 外显子的突变与先天性骨骺发育不良相关[9]。*COL9A1* 基因的突变与 Stickler 综合征相关[10]。

为了探讨 ICTEV 和 *COL9A1* 基因表达水平的关系,本研究分析了 ICTEV 患儿和正常对照的足部肌肉及肌腱组织中 *COL9A1* 基因的表达情况。免疫组化染色显示,COL9A1 蛋白表达于软骨组织的细胞外基质,25 例 ICTEV 患儿中 22 例(88%)表达阳

性,5 例正常组织中 2 例 COL9A1 表达阳性,占 20%,表明 COL9A1 表达上调与 ICTEV 发生具有相关性。

本研究在所有的样本中均未检测到 rs35470562 多态的存在,提示此 SNP 位点在中国北方人群中可能不存在多态;rs1135056 位点存在 A/G 多态,与数据库中报道的多态性一致。rs1135056 位点患者组 G 等位基因频率高于对照组;与对照组相比,ICTEV 组中 AA 基因型频率降低,AG、GG 基因型频率增高。提示此 SNP 位点与 ICTEV 有明显的相关性,具有 G 等位基因的人发生 ICTEV 的风险性相对增高。

本研究结果提示:软组织的异常可能在 ICTEV 的发生中发挥重要的作用。COL9A1 蛋白表达上调破坏了关节软骨内环境的稳定性,从而影响足部的正常发育。rs1135056 是位于 *COL9A1* 基因编码区内引起氨基酸改变的 cSNP,G 等位基因与 A 等位基因所对应的氨基酸不同,引起蛋白质空间构象改变,从而影响其与其他蛋白间的相互作用,进而影响足部发育。可能存在与 rs1135056 相连锁的其他基因的异常,从而引起足部异常发育,导致 ICTEV 的发生。因此,下一步的工作是在 rs1135056 附近选择更多的 SNP 位点进行相关性分析,寻找 ICTEV 的易感基因。

[参 考 文 献]

[1] Miedzybrodzka Z. Congenital talipes equinovarus (clubfoot): a disorder of the foot but not the hand[J]. J Anat, 2003, 202(1):37-42.

[2] Dobbs MB. Clubfoot: etiology and treatment: editorial comment[J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(5): 1119-1120.

[3] Barker S, Chesney D, Miedzybrodzka Z, Maffulli N. Genetics and epidemiology of idiopathic congenital talipes equinovarus[J]. J Pediatr Orthop, 2003, 23(2): 265-272.

[4] McCarthy CB, Romanowski V. A simplified method for the extraction of baculoviral DNA for PCR analysis: a practical application[J]. J Virol Methods, 2008, 148(1-2): 286-290.

[5] Kimura T, Mattei MG, Stevens JW, Goldring MB, Ninomiya Y, Olsen BR. Molecular cloning of rat and human type IX collagen cDNA and localization of the alpha1 (IX) gene on the human chromosome 6[J]. Eur J Biochem, 1989, 179(1): 71-78.

[6] Warman ML, Tiller GE, Polumbo PA, Seldin MF, Rochelle JM, Knoll JH, et al. Physical and linkage mapping of the human and murine genes for the alpha 1 chain of type IX collagen (COL9A1)[J]. Genomics, 1993, 17(3): 694-698.

[7] Muragaki Y, Nishimura I, Henney A, Ninomiya Y, Olsen BR. The alpha-1 (IX) collagen gene gives rise to two different transcripts in both mouse embryonic and human fetal RNA[J]. Proc Nat Acad Sci, 1990, 87(7): 2400-2404.

[8] Posey KL, Hankenson K, Veerisetty AC, Bornstein P, Lawler J, Hecht JL. Skeletal abnormalities in mice lacking extracellular matrix proteins, thrombospondin-1, thrombospondin-3, thrombospondin-5, and type IX collagen[J]. Am J Pathol, 2008, 172(6):1664-1674.

[9] Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozlowski K, Perälä M, Carter L, et al. A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity[J]. Am J Hum Genet, 2001, 69(5): 969-980.

[10] Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, et al. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene[J]. Am J Hum Genet, 2006, 79(3): 449-457.

(本文编辑:俞 燕)