

· 论 著 ·

干扰 SEDL 基因表达对软骨细胞生理活性的影响

丁小燕 胡玉娟 廖飞 朱高慧 朱岷 罗庆 宋萃 熊丰*

重庆医科大学附属儿童医院内分泌科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014

中图分类号: R394.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 12-1451-06

摘要: **目的** 初步研究干扰 SEDL 基因表达后对人软骨细胞中 II 型胶原蛋白表达水平、内质网位置分布及超微结构和软骨细胞活性的影响。**方法** 将靶向干扰 SEDL 基因的病毒转染入人软骨细胞中, QPCR 及 Western Blot 分别检测 SEDL 基因及 Sedlin 蛋白表达水平, 评价干扰 SEDL 基因的软骨细胞模型是否建立成功; 免疫荧光及 Western Blot 检测 II 型胶原蛋白表达情况, 荧光探针检测内质网位置分布改变, 电镜检测内质网超微结构改变, MTT 法检测软骨细胞增殖活性情况。**结果** (1) 转染干扰 SEDL 基因病毒的软骨细胞 SEDL 基因表达明显降低, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。Sedlin 蛋白表达降低, 表明干扰 SEDL 基因的细胞模型构建成功。(2) 随着 Sedlin 蛋白的减少, II 型胶原蛋白表达量降低, 具有统计学差异 ($P < 0.05$)。(3) 细胞模型中内质网分布发生改变, 其形态变圆, 触角变少, 颜色变淡, 细胞与细胞间内质网荧光排列不规则, 紊乱。(4) 电镜下观察, 细胞模型中内质网超微结构出现水肿扩张。(5) 转染干扰 SEDL 基因病毒的软骨细胞活性在 48 h 达峰, 之后细胞活性下降, 且具有统计学差异 ($P < 0.05$)。**结论** Sedlin 降低影响软骨细胞 II 型胶原蛋白表达, 软骨细胞中内质网形态位置分布及超微结构发生改变, 致使软骨细胞活性降低。

关键词: X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良; SEDL 基因; Sedlin; 软骨细胞

The influence of interferential SEDL gene in the physiological activity of human chondrocytes

DING Xiaoyan, HU Yujuan, LIAO Fei, ZHU Gaohui, ZHU Min, LUO Qing, SONG Cui, XIONG Feng*

Department of Endocrinology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China

Corresponding author: XIONG Feng, Email: xiongf2013@163.com

Abstract: **Objective** To preliminarily study the influence of interferential SEDL gene in the expression of collagen II, distribution and ultrastructure of endoplasmic reticulum, and the activity of human chondrocytes. **Methods** Lentivirus which can target interference SEDL gene was transfected into human cartilage cells (HC-a). The expression of SEDL gene and Sedlin protein were detected using QPCR and Western blotting. The establishment of cartilage cell model with SEDT gene was evaluated. The expression of collagen II was detected using Western blotting and immunofluorescence. The ultrastructural changes of endoplasmic reticulum were tested using electron microscope. MTT method was used to detect the proliferation of the cartilage cells. **Results** (1) The expression of SEDL gene in the cartilage cells was significantly reduced after lentivirus was transfected ($P < 0.05$), and the expression of Sedlin protein was also decreased, indicating that the SEDT cell model was successfully established. (2) With the decrease of expression of Sedlin protein, the expression of collagen II was observably reduced ($P < 0.05$). (3) The distribution of endoplasmic reticulum was changed in the cell model. The cells became round in shape, less protrusion, fade in color, and the endoplasmic reticulum arranged irregularly. (4) The edematous endoplasmic reticulum was observed under transmission electron microscope. (5) Activity of the cells reached peak within 48h after lentivirus transfection. Then the cell activity significantly declined ($P < 0.05$). **Conclusion** The reduced expression of Sedlin results in the decline of collagen II expression. The changed distribution and ultra microstructure of endoplasmic reticulum result in a decrease of cartilage cell activity.

Key words: X-linked spondyloepiphyseal dysplasia; SEDL gene; Sedlin; Cartilage cell

基金项目: 重庆市自然科学基金计划重点项目 (CSTC, 2007BA5028)

* 通讯作者: 熊丰, Email: xiongf2013@163.com

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异常和关节软骨退行性变,临床特点表现为非匀称性矮小。在4~10岁出现生长迟缓及影像学表现:椎体不规则变扁,前部上下缘凹陷,中后部驼峰样突起,椎间隙明显狭窄及大关节软骨的退行性变等改变。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,最终致残^[1-2]。其发病机制不清楚,尚无有效治疗方法。

目前已明确SEDT的发病是由于位于Xp22.2上的SEDL基因突变有关,而SEDL基因所编码的惟一蛋白产物为Sedlin蛋白^[3]。Sedlin是转运蛋白复合物(transport protein particle, TRAPP)的亚单位,也叫TRAPPC2,其功能尚不十分明确,较肯定的作用主要有:(1)参与在内质网至高尔基体间囊泡运输的定位和融合^[4-7]。(2)参与大分子胶原蛋白形成正常的转运形式而转出内质网至高尔基体^[8]。此外,已发现另两种与SEDT有相似临床表现及病理特点的同类疾病即先天性脊柱骨骺发育不良(SEDC)和晚发型脊柱骨骺发育不良伴进行性骨关节病(SEDT-PA)的发病机制均与II型胶原蛋白合成异常有着直接或间接的关系^[9-11]。SEDT的主要病理改变为脊柱的软骨内成骨障碍,II型胶原蛋白是软骨细胞外基质的主要特异性成分。SEDT的发病是否为SEDL基因突变致使Sedlin蛋白功能缺陷,导致大分子胶原蛋白的转运障碍所致。其次,Sedlin蛋白参与在内质网至高尔基体间囊泡运输的定位和融合,与内质网必定有很大关联。故本次研究初步探索Sedlin蛋白降低对II型胶原蛋白表达及内质网本身的影响,旨在为进一步研究SEDT发病机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Western Blot电泳装置与蛋白印记转移器为Bio-RAD公司,-80℃冰箱ThermoForma公司。所以目的基因引物片段由上海华大合成,RT-PCR试剂盒及2×Taq PCR MasterMix试剂盒购自TaKaRa公司,胎牛血清(FBS)与DMEM/F12培养基购自Gibco公司,SDS-PAGE凝胶配置试剂盒与细胞全蛋白提取试剂盒购自南京凯基,Tween 20购自上海生工,5×蛋白上样缓冲液为碧云天研究所,PVDF膜

为Solarbio公司,I型胶原蛋白一抗为ABCCAM,II型胶原蛋白一抗为武汉三鹰公司,荧光二抗均为Jackson公司,山羊血清为中衫金桥公司,鼠β-actin单克隆抗体为联科生物有限公司,内质网荧光探针(ER-Green)购自南京凯基。

1.2 病毒和细胞

干扰SEDL基因片段由本课题组前期构建,本次实验病毒由上海吉凯公司合成,为不带荧光的干扰SEDL基因慢病毒。人软骨细胞(HC-a)购买于美国ScienCell公司。

1.3 细胞培养

超净工作台紫外线消毒30 min,液氮罐中取出冻存的细胞,水浴箱中37℃水浴快速溶解,微量加样枪将细胞悬液转移至25 cm²一次性培养瓶中,再加入4 ml软骨细胞(含10% FBS)培养基中,置于37℃、5% CO₂孵箱培养12 h后更换新鲜培养基。当细胞融合度达到85%时进行细胞传代,0.25%胰酶消化后离心,用培养基混悬细胞,以最适合的细胞密度传代细胞进行实验。

1.4 干扰SEDL基因慢病毒及阴性慢病毒的转染

实验分为3组,即转染干扰SEDL慢病毒组(LV组)、转染阴性慢病毒对照组(LV-组)及正常组(空白对照组)。待HC-a融合度达到70%~80%时,将干扰SEDL基因的慢病毒(LV-SiSEDL)及阴性慢病毒(LV-)分别转染至HC-a后,置于37℃、5% CO₂孵箱培养12 h后更换新鲜培养基。

1.5 QPCR反应

细胞转染病毒4天后,Trizol抽提RNA,行逆转录后,SYBR Premix TaqTMII5ul、PCR引物0.8 ul,cDNA 1 ul,H₂O补平体积10 ul;反应条件:95℃ 3 min,95℃ 10 s,54.2℃ 60 s,读板,共50个循环;融解曲线分析:温度55℃~95℃。每个样设置3个复孔。SEDL上游引物5'-TGACATTGCGTTTCC GTTGT-3',下游引物5'-ATGGCTCCTCACA GCACACA-3';β-actin上游引物5'-AAGATGAC CCAGATCATGTTTGAGACC-3',下游引物5'-GCCAGGTCCAGACGCGAGGAT-3'。所有实验样本均采用3管重复,重复3次,取其平均值。

1.6 细胞爬片

将已经用赖氨酸包被好的无菌爬片置于24孔板中,按1×10⁴/孔的细胞密度进行细胞爬片,实验分3组:LV组、LV-组、空白对照组,每组设3个复孔。细胞培养16~18 h后予以不同处理,处理72 h后进行免疫荧光处理。

1.7 荧光探针

实验分为 3 组:LV 组、LV-组、空白对照组,每组设 3 个复孔。按照试剂盒说明进行细胞内质网标记,随后用荧光显微镜观察及拍照。

1.8 免疫荧光

将爬片好的 3 组软骨细胞 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 3% H_2O_2 20 min; PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 1% BSA 封闭 30 min, 加入稀释的一抗, 于 4℃ 冰箱过夜; PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; 加入 1% BSA 稀释的二抗, 于 37℃ 杂交 1 h; PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min; DAPI 染色 15 min; PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min 抗淬灭封片剂封片, 预约荧光显微镜拍照。

1.9 Western blot

按照试剂盒说明提取 3 组细胞总蛋白后, 测量总蛋白的浓度计算所加入的总蛋白量, 总蛋白样品上样到 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行蛋白电泳。电泳结束后, 用半干转膜法将 sedlin 蛋白和 β -Actin 分别转到不同的 PVDF 膜上, 室温下用封闭液摇床封闭 1 h 后, 用抗 II 型胶原蛋白抗体及 Sedlin 蛋白抗体和 β -Actin 的抗体(蛋白抗体:1:500; β -Actin:1:2000)4℃ 孵育过夜后, 孵二抗(1:2000)室温孵育, 化学发光曝光成像, 凝胶成像后行灰度扫描分析。

1.10 电泳样品制备

细胞转染病毒 4 天后, 用 0.1% 胰酶消化, 将细胞悬液加入离心管中, 以离心速度 800 r/min, 5 min 离心, 弃上清液, 保留细胞悬液, 再将细胞团块吹散, 将细胞悬液加入 1.5 ml EP 管中, 1200 r/min, 10 min 离心, 弃上清液, 加入 4% 戊二醛固定液放置 4℃ 冰箱保存, 尽快送变电镜室进行常规电镜样品固定、脱水和包埋, 超薄切片后在 H-7500 透射电镜下观察拍照。

1.11 MTT 法

2 组软骨细胞以 1.0×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板(每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次), 培养基总体积 200 μ l/孔, 待细胞生长融合度达 70% 时更换培养基, 第一组加干扰 SEDL 基因慢病毒, 第二组加 PBS, 放置 37℃, 5% CO_2 培养箱培养; 10~12 h 后更换新鲜培养基, 继续孵育; 在加病毒 0 h、24 h、48 h、72 h 这 4 个时间点检测细胞增殖, 向 96 孔板中加入 20 μ l/孔 MTT 溶液, 培养箱孵育; 4 h 后, 小心吸弃培养液, 加入 150 μ l/孔 DMSO, 脱色摇床避光低速摇晃 10 min, 酶联免疫仪检测 490 nm 处各孔吸光度值

(OD)。

1.12 统计学处理

使用 SPSS 17.0 统计软件, 采用单因素方差分析、两两比较进行数据分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 将 LV-SiSEDL 转染入人软骨细胞(HC-a)后 SEDL 基因及 Sedlin 蛋白的影响

QPCR 反应结果提示 LV 组、LV-组及空白对照组在病毒转染 4 天后, LV 组 SEDL 基因表达量(0.576 ± 0.029)明显比 LV-组(1.240 ± 0.099)及空白组(0.968 ± 0.070)降低, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Western Blot 显示 Sedlin 蛋白在 LV 组中表达量最低, 其次为 LV-组, 最高为空白对照, 见图 1。这说明干扰 SEDL 基因成功, Sedlin 蛋白降低的 SEDT 软骨细胞模型构建成功。

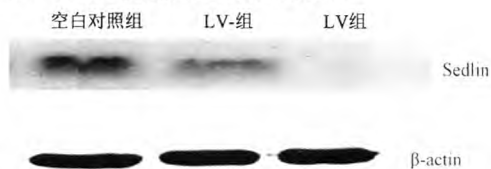


图 1 Western Blot 检测 Sedlin 表达水平

Fig. 1 The expression of Sedlin detected with Western blotting

2.2 SEDT 细胞模型中 II 型胶原蛋白表达水平

免疫荧光标记 II 型胶原蛋白显示 LV 组较 LV-组及空白对照组 II 型胶原蛋白表达明显变少, 空白对照与 LV-组无明显差别(见图 2 中 CY3), 利用 ImageJ 软件分析各组 CY3 光密度值, 得到 LV 组(0.02367 ± 0.000816)比 LV-组(0.04733 ± 0.002055)及空白对照组(0.04700 ± 0.002828)低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2。在 Western Blot 中, LV 组 II 型胶原蛋白表达量明显低于 LV-组及空白对照组, 见图 3。这些说明 SEDT 细胞中, II 型胶原蛋白合成减少。

2.3 SEDT 细胞模型中内质网改变情况

探针标记内质网可以看出内质网总体分布, 在两组对照组中, 标记内质网的绿色荧光都是沿着软骨细胞形态呈梭形分布, 细胞与细胞之间的内质网排列规则(见图 4 中空白对照及 LV-组)。在 LV 组中标记内质网的绿色荧光形态变圆, 触角变少, 颜色变淡, 细胞与细胞间内质网荧光排列不规则、紊乱

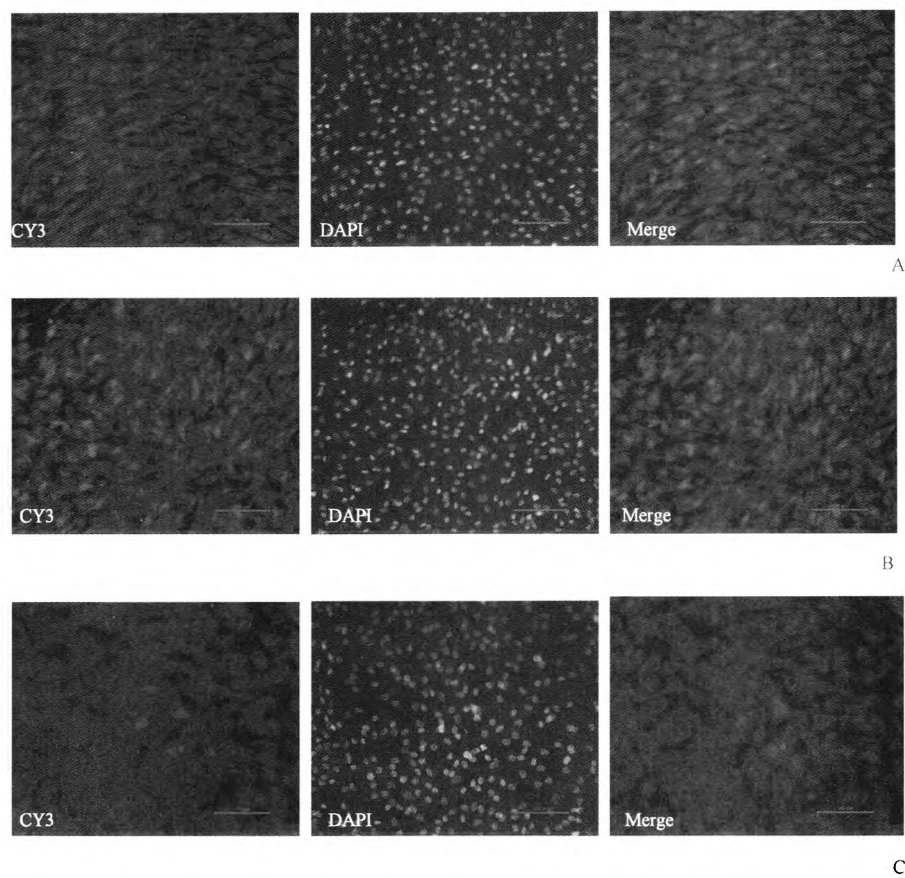


图 2 免疫荧光观察人软骨细胞 II 型胶原蛋白表达情况 (CY3 标记 II 型胶原蛋白; DAPI 标记细胞核; Merge 表示 CY3 与 DAPI 组合在一起)。A: 正常对照组; B: LV-组; C: LV 组

Fig. 2 Immunofluorescence observation of the expression of type II collagen (CY3 marks type II collagen; DAPI marks the cell nucleus; Merge shows CY3 overlap DAPI). A: Normal group; B: LV-group; C: LV group.

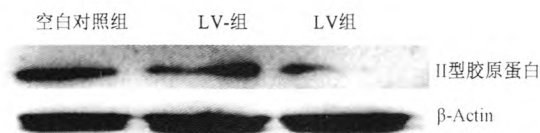


图 3 Western Blot 印迹杂交检测转染病毒后 II 型胶原蛋白表达

Fig. 3 The expression of type II collagen after lentivirus transfection detected with Western blotting

(见图 4 中 LV 组), 这提示在 SEDT 细胞模型中内质网在细胞中的分布可能出现异常改变。并且在电镜结果中显示 LV 组内质网明显扩张, 内部颜色变淡, 说明内质网出现水肿情况; LV-组内质网形态正常; 空白对照组内质网稍扩张, 内部颜色稍深, 内质网稍扩张可能是细胞代谢旺盛引起 (见图 5)。

2.4 MTT 法检测 SEDT 细胞模型的细胞活性

LV 组与两组对照组比较, 对照组活性稍高于 LV 组。统计分析显示, 在 48 h、72 h、96 h 及 120 h

时, 3 组细胞的活性差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。但在 144 h 这一时点, 2 组对照组的细胞活性较 LV 组细胞活性高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。LV 组细胞的活性在 120 h 时达峰, 之后细胞活性下降, 而两组对照组在 120 h 并未达峰, 见表 1。提示 SEDT 细胞模型中细胞活性下降。

表 1 不同时点 3 组细胞活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell activity among the three groups at different time points ($\bar{x} \pm s$)			
时间 (h)	空白对照组	LV-组	LV 组
48	0.1516 $\pm$ 0.01016	0.1376 $\pm$ 0.0146	0.12440 $\pm$ 0.11480
72	0.3000 $\pm$ 0.04778	0.2379 $\pm$ 0.0650	0.24070 $\pm$ 0.06300
96	0.3100 $\pm$ 0.09000	0.3273 $\pm$ 0.1069	0.26470 $\pm$ 0.02170
120	0.4834 $\pm$ 0.10000	0.4698 $\pm$ 0.0930	0.40000 $\pm$ 0.05000
144	0.6354 $\pm$ 0.15350	0.5487 $\pm$ 0.0371	0.32790 $\pm$ 0.07745 ^a

注: ^a表示同一时点组间比较, $P < 0.05$

3 讨论

本次实验, 笔者发现在蛋白水平上, II 型胶原蛋

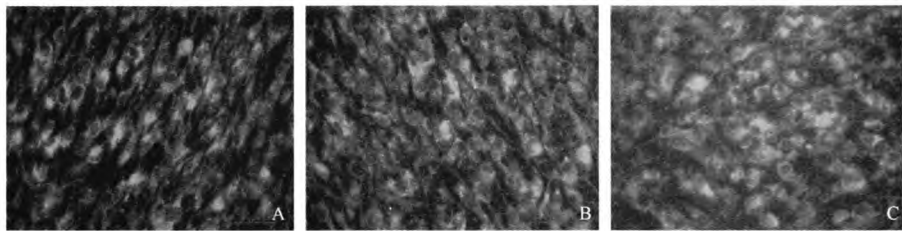


图 4 荧光探针标记内质网(×200)。A:正常对照组;B:LV-组;C:LV 组

Fig. 4 Fluorescence probe labeling of the endoplasmic reticulum in three groups (×200). A:Normal group; B:LV-group; C:LV group

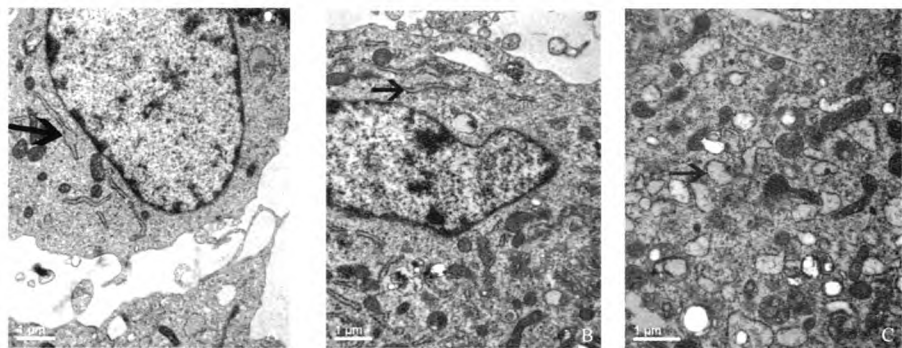


图 5 透射电镜观察各组人软骨细胞的超微结构(×12000),箭头处指示为内质网超微结构。A:正常对照组;B:LV-组;C:LV 组

Fig. 5 Transmission electron microscope observation of the ultrastructure of chondrocytes in each group (×12000), arrows indicate the ultrastructure of endoplasmic reticulum. A:Normal group; B:LV-group; C:LV group.

白表达量明显降低,说明 Sedlin 蛋白的功能与 II 型胶原蛋白的表达具有很大关联。结合 Sedlin 蛋白的主要作用是参与构成转运蛋白复合体 (TRAPP), TRAPP 的主要作用是以囊泡的形式从内质网至高尔基体运输合成好的蛋白,所以 Sedlin 蛋白可能参与 II 型胶原蛋白从内质网至高尔基体间的转运。这与 Venditti R 等^[8] 研究发现结果一致,他们用 Sedlin 敲出掉的软骨细胞发现了 II 型胶原蛋白及 I 型胶原蛋白滞留在内质网中而没有运转至高尔基体及分泌到细胞外。笔者推测, Sedlin 蛋白功能障碍使得大分子胶原蛋白无法形成正常的转运形式而转出内质网,导致胶原蛋白无法分泌至细胞外形成正常的胶原纤维。

对于 Sedlin 蛋白的降低对内质网本身是否有影响,本次实验利用标记内质网的荧光探针对于细胞内内质网分布进行初步研究发现,干扰 Sedlin 蛋白表达后,标记内质网的荧光没有像对照组样沿着细胞形态呈梭形分布,细胞与细胞间内质网荧光排列规则,而是出现总体形态变圆,颜色模糊,细胞与细胞间内质网排列紊乱。同时,笔者在透射电镜下观察

到,干扰 Sedlin 蛋白后,内质网超微结构出现明显水肿扩张。两组实验均提示 Sedlin 蛋白对细胞内内质网本身确实有极大影响。另外, Tiller 等^[12] 用 SEDT 病人的股骨头关节软骨组织在电镜下观察发现,在软骨细胞的超微结构中内质网出现扩张及高尔基体变多的情况。内质网是细胞内膜构成的封闭网状管道系统,膜约占细胞总膜面积的一半,是真核细胞中膜最多的细胞器,具有高度的多型性。在病理状态下,内质网可发生量和形态的改变。在蛋白质合成及分泌活性高的细胞,粗面内质网会增多,在萎缩的细胞(如饥饿时)以及有某种物质贮积的细胞,其粗面内质网则萎缩、减少。所以,内质网的形态和分布在一定程度上反映细胞的生长状态。但是此种内质网出现的异常,究竟是由于 Sedlin 直接参与构成内质网内膜的结构组成成分还是由于软骨细胞中 Sedlin 蛋白的降低导致 II 型胶原蛋白分泌异常滞留在内质网中引起,还需要进一步实验证实。

与此同时,笔者通过检测细胞的活性发现, Sedlin 蛋白降低后,软骨细胞活性降低。II 型胶原蛋白对于软骨细胞无论是增殖活性还是细胞分化都

具有重要意义,Wei Xin 等人^[13]在靶向沉默 II 型胶原蛋白的小鼠中得出 II 型胶原蛋白不仅在软骨细胞培养中是基础,还对软骨细胞分化有着重要的作用。故在此笔者推测由于 Sedlin 蛋白的减少,导致胶原蛋白分泌减少,无法形成正常的细胞外基质,以及使内质网发生异常从而影响了软骨细胞生长发育,最后使得软骨组织发育不良。

综上所述,Sedlin 蛋白的主要作用不仅对胶原蛋白有转运作用,还对内质网的形态功能及分布有极大关联。所以,笔者推测 SEDT 疾病是由于 SEDL 基因突变后,导致其唯一对应的功能蛋白 Sedlin 功能缺失,致使 TRAPP 以囊泡形式从内质网至高尔基体转运胶原蛋白的功能障碍,从而无法形成正常的细胞外基质;以及 Sedlin 蛋白功能的缺失,和/或胶原蛋白分泌障碍而滞留于内质网腔中出现内质网形态分布异常,从而影响软骨细胞生长发育,致使软骨发育不良。但是此次实验的不足是,没有明确内质网出现的异常是由于 Sedlin 蛋白直接参与还是由于 Sedlin 蛋白降低导致 II 型胶原蛋白分泌异常滞留于内质网中引起,故还需进一步实验验证证实。

【参 考 文 献】

- [1] Wynne-Davies R, Gormley J. The prevalence of skeletal dysplasias. An estimate of their minimum frequency and the number of patients requiring orthopaedic care. *Journal of Bone & Joint Surgery*, 1985, 67(1):133-137.
- [2] MacKenzie J, Fitzpatrick J, Babyn P, et al. X linked spondyloepiphyseal dysplasia: a clinical, radiological, and molecular study of a large kindred. *Journal of medical genetics*, 1996, 33(10):823-828.
- [3] Savarirayan R, Thompson E, Gecz J. Spondyloepiphyseal dysplasia tarda (SEDL, MIM #313400). *Eur J Hum Genet*, 2003, 11(9):639-642.
- [4] Gecz J, Shaw MA, Bellon JR, et al. Human wild-type SEDL protein functionally complements yeast Trs20p but some naturally occurring SEDL mutants do not. *Gene*, 2003, 320:137-144.
- [5] Jang SB, Kim YG, Cho YS, et al. Crystal structure of SEDL and its implications for a genetic disease spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *J Biol Chem*, 2002, 277(51):49863-49869.
- [6] Liu X, Wang Y, Zhu H, et al. Interaction of Sedlin with PAM14. *J Cell Biochem*. 2010, 109(6):1129-1133.
- [7] Zong M, Wu XG, Chan CW, et al. The adaptor function of TRAPPC2 in mammalian TRAPPs explains TRAPPC2-associated SEDT and TRAPPC9-associated congenital intellectual disability. *PLoS One*, 2011, 6(8):e23350.
- [8] Venditti R, Scanu T, Santoro M, et al. Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the sar1 cycle. *Science*, 2012, 337(6102):1668-1672.
- [9] 夏欣一, 周玉春, 崔英霞, 等. SEDL 基因突变致迟发性脊柱骨骺发育不良机制的初步研究. *医学研究生学报*, 2010, 23(8):800-804.
Xia XY, Zhou YC, Cui YX, et al. A pilot study on the mechanism of spondyloepiphyseal dysplasia tarda caused by SEDL gene mutation. *Journal of Medical Postgraduates*, 2010, 23(8):800-804. (in Chinese)
- [10] 崔英霞, 夏欣一, 杨滨, 等. COL2A1 基因突变致先天性脊柱骨骺发育不良软骨组织的超微结构观察. *医学研究生学报*, 2009, 22(4):376-379.
Cui YX, Xia XY, Yang B, et al. Ultrastructural study on spondyloepiphyseal dysplasia congenita cartilage resulted from COL2A1 gene mutation. *Journal of Medical Postgraduates*, 2009, 22(4):376-379. (in Chinese)
- [11] 杨雅, 王敏, 周厚德, 等. WISP3 突变型 C20/A4 软骨细胞 II 型胶原的动力学及定位研究. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(9):625-631.
Yang Y, Wang M, Zhou HD, et al. The kinetics and localization of collagen II in C20/A4 chondrocytes with WISP3 mutant. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2010, 16(9):625-631. (in Chinese)
- [12] Tiller GE, Hannig VL, Dozier D, et al. A recurrent RNA-splicing mutation in the SEDL gene causes X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6):1398-1407.
- [13] Xin W, Heilig J, Paulsson M, et al. Collagen Ii Regulates Integrin Expression Profile And Chondrocyte Differentiation. *Connect Tissue Res*, 2015, 56(4):307-314.

(收稿日期: 2015-04-21)