

徐令东, 陈 萌, 张 华, 等. PTHrP - Ihh 信号轴在肉鸡胫骨软骨发育不良发生中的调控机理[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 202 - 204.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.066

# PTHrP - Ihh 信号轴在肉鸡胫骨软骨发育不良发生中的调控机理

徐令东, 陈 萌, 张 华, 葛 康, 陆宗阳, 王添翔, 周振雷

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要:**采用福美双诱导建立肉鸡胫骨软骨发育不良(tibial dyschondroplasia, TD)模型, 研究甲状旁腺素相关肽-印第安刺猬蛋白(PTHrP - Ihh)信号轴在肉鸡发生胫骨软骨发育不良中的调控机制。100 羽 1 日龄健康 Ross308 肉鸡经 1 周预饲后, 随机分为 2 组, 对照组饲以基础日粮, 试验组在饲喂 8.9 d 时饲以基础日粮并添加 100 mg/kg 福美双, 之后继续饲以基础日粮; 于 15 日龄时采集组织样本, 进行检测。结果显示, 与对照组比较, 试验组体重质量极显著降低, 但 TD 发生率极显著升高; 胫骨与肱骨的骨长度、骨密度, 胫骨与股骨的骨强度均显著或极显著降低, 而肱骨的骨指数显著增强; TD 肉鸡胫骨生长板软骨组织 *Ihh*、*PTHrP* 的 mRNA 表达极显著下降, *Col X* mRNA 表达极显著上升。试验表明, PTHrP - Ihh 信号轴调控紊乱, 会影响生长板软骨细胞的分化和 *ColX* 表达, 导致肉鸡形成胫骨软骨发育不良。

**关键词:**胫骨软骨发育不良; 肉鸡; PTHrP - Ihh 信号轴

**中图分类号:** S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0202-03

现代肉鸡品种的选育过程中, 注重肉鸡快速增质量的选育方式对肉鸡的生理机能产生了显著的影响, 同时导致腿病, 尤其是胫骨软骨发育不良(tibial dyschondroplasia, TD)的发病率显著增加, 不仅影响动物福利, 同时也带来了较大的经济损失<sup>[1]</sup>。胫骨软骨发育不良是现代肉鸡养殖业最常见、危害最严重的骨骼疾病之一, 该病以在胫骨近端生长板下形成无血管、未钙化、不透明的软骨栓为主要特征。TD 的发病机理十分复杂, 近年来研究表明, 软骨细胞的增殖、分化、凋亡失控进而导致软骨内成骨异常可能是 TD 发生的重要原因之一, 然而相关机理至今尚未清楚<sup>[2]</sup>。甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP) - 印第安刺猬蛋白(Indian hedgehog, *Ihh*)信号轴是软骨内成骨过程中调节软骨和成骨细胞增殖、分化、肥大、矿化的重要调控轴, 其在肉鸡 TD 发生中的作用尚未见报道。本试验通过饲料中添加福美双的方法, 诱导建立肉鸡 TD 模型, 研究肉鸡胫骨形生长板 PTHrP - Ihh 信号轴和相关因子的变化及其相互作用关系, 为探明肉鸡 TD 发生的机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验仪器

X 射线机(北京万东医疗装备股份有限公司); BS-300 生化分析仪(迈瑞公司); LR10K PLUS 骨强度测定仪(Lloyd

Instruments Ltd., 英国); RM2235 软组织切片机(Leica, 德国); H5505 光学显微镜(Nikon, 日本); 自动生化分析仪(Selectar E, 荷兰); MICROTEK5600 透射式扫描仪(上海中晶科技有限公司)。

### 1.2 试验材料

福美双, 购于南京寿德试验器材有限公司; 血浆钙、磷、碱性磷酸酶生化检测试剂盒, 购于迈瑞公司; cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version)、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒、蛋白分子量标准, 购于宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.3 试验动物

100 羽 1 日龄 Rose308 肉鸡购自南京长芦孵化场, 随机分为试验组、对照组, 每组 5 个重复, 每个重复 10 羽鸡。严格控制鸡舍的温湿度, 最初 2 d 温度维持在 35 ℃, 之后在 1 周内逐渐降到 21 ℃, 并一直维持该温度直到试验结束。空气湿度维持在 45% 左右。每天光照 23 h, 暗处理 1 h。饲喂滁州正大生产的商品雏鸡料(代谢能 13.39 MJ/kg, 粗蛋白 23.0%)。试验期间自由采食和饮水, 对照组饲喂基础日粮; 试验组饲喂基础日粮 7 d 后, 饲喂基础日粮中添加 100 mg/kg 福美双的日粮, 饲喂 2 d 后停止饲喂, 继续饲以基础日粮直至试验结束。试验为期 15 d。

### 1.4 试验方法

**1.4.1 样品的采集** 在 15 日龄时, 每组随机挑选 30 羽鸡, 对每羽鸡进行编号、称质量、心脏采血后处死。血液于 37 ℃ 静置 30 min, 然后于 2 500 g 离心收集血清, 检测血浆中钙、磷、碱性磷酸酶的水平; 将每羽鸡左侧的肱骨、股骨、胫骨取下分别装入各自的自封袋中, -20 ℃ 保存备用, 用于骨长、骨指数、骨密度、骨强度测定; 每个处理随机选取 5 羽鸡, 剥取右侧胫骨, 分离生长板, 液氮速冻后, -20 ℃ 保存备用。

**1.4.2 肉鸡 TD 发病率的测定** 取右胫骨, 纵切, 参照 TD 评分标准<sup>[3]</sup>判定 TD 发病程度。以每组 3 个重复发病率的平均

收稿日期: 2014-08-26

基金项目: 江苏省自然科学基金(编号: BK2011648); 江苏省大学生实践创新计划(编号: JSS1221)。

作者简介: 徐令东(1991—), 男, 吉林白山人, 主要从事动物医学研究。E-mail: 739733179@qq.com。

通信作者: 周振雷, 博士, 副教授, 主要从事畜禽骨骼生物学、临床兽医学研究。E-mail: zhoulz@njau.edu.cn。

值为每组的发病率,并统计其差异。

1.4.3 骨生长发育指标的测定

1.4.3.1 骨指数和骨长度的检测 检测前,将每根骨头解冻过夜,刮除骨头上所有的软组织。对每根骨头称质量并用游标卡尺测其长度。骨指数的计算公式是:

骨指数 = 骨质量(g)/体质量(kg)<sup>[4]</sup>。

1.4.3.2 骨放射密度的检测 将肱骨、股骨、胫骨样本与 16 级铝阶(英国 Roslin 研究所馈赠)置于同一暗盒上,拍片(富士医用 X 线胶片,25.4cm×30.5cm)。肱骨、股骨、胫骨采用前后位拍摄,摄片条件:焦点胶片距 80 cm,球管电压与毫安秒分别为 44kV、3.88mAs<sup>[5]</sup>。所摄 X 线片扫描后,用 NIH Image J 1.32j 图像处理系统分析扫描图像。骨骼样本的放射密度用毫米铝阶厚度(mm Al)表示。

1.4.3.3 骨强度的检测 用三点弯曲试验检测骨强度<sup>[6]</sup>。在骨骼样本的中点处标记,用游标卡尺测量每根骨样本此处的直径。根据骨骼样本长度确定跨距。用骨强度测定仪测定骨骼强度。预载荷速度设为 3 mm/min,骨骼断裂时停止。通过 NEXYGEN PLUS 软件分析曲线的最高点即为骨强度(单

位为 N)。

1.4.4 实时定量荧光 PCR

1.4.4.1 总 RNA 的提取与纯化 提取对照组健康肉鸡、试验组 TD 肉鸡生长板 100 mg,液氮研磨,加入 1 mL TRIzol 试剂匀浆,室温静置 5 min。总 RNA 的提取方法按 TRIzol 试剂说明书操作。最后加入 100 μL DEPC 处理水完全溶解总 RNA。用核酸蛋白检测仪测定总 RNA 浓度、纯度,使 D<sub>260 nm</sub>/D<sub>280 nm</sub> 保持在 1.8~2.0。

1.4.4.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中鸡的 PTHrP、Ihh、Runx2、Ⅱ型胶原(Col Ⅱ)、X 型胶原(Col X)的核苷酸序列,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 自行设计引物或参考相关文献。Gapdh 基因作为内参基因。引物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

1.4.4.3 样品 cDNA 的制备与 PCR 采用 10 μL 反转录反应体系,并按 cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version)说明书操作。然后采用 20 μL PCR 反应体系,并按 SYBR Premix Ex TaqTM 的说明书操作。以 GAPDH 为内参,测定 PTHrP、Ihh、Runx2、Col Ⅱ、Col X 基因在组织中的相对表达量。

表 1 目的基因 RT-PCR 引物序列

| 目的基因               | 引物序列                                                                | 产物长度(bp) |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------|----------|
| Collagen Ⅱ (Col Ⅱ) | F:5'-GATGCCACCCTCAAATCCCT-3';R:5'-CAGAGTTTGATGTCGCGGC-3'            | 101      |
| Collagen X (Col X) | F:5'-AGTGTCTCATTTGATCTCATGGA-3';R:5'-TCAGAGGAATAGAGAGACCATTGGATT-3' | 101      |
| Runx2              | F:5'-TAAAGGTGACGGTGGATGG-3';R:5'-TGTGGATTAAAAGGACTTGGTG-3'          | 190      |
| PTHrP              | F:5'-CGGAGGATATGATGTTTAC-3';R:5'-TAGGAGGGCACAGAATAAC-3'             | 79       |
| Ihh                | F:5'-ACAGGGACCGCAACAAGT-3';R:5'-CAGCCGAGTGCTCTGACT-3'               | 122      |
| GAPDH              | F:5'-GAACATCATCCCAGCGTCCA-3';R:5'-CGGCAGTCAAGTCAACAAC-3'            | 132      |

1.5 统计分析

使用 SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, 美国)统计软件进行数据分析。所有数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA, Duncan's)。

2 结果与分析

结果显示,与对照组相比,试验组肉鸡 TD 发病率极显著升高( $P < 0.01$ ),TD 评分明显增大,体质量极显著降低( $P < 0.01$ ) (表 2)。与对照组相比,试验组的血钙、血磷水平显著下降,碱性磷酸酶活性无显著差异(表 3)。与对照组相比,试验组胫骨的骨密度差异极显著( $P < 0.01$ ),骨强度、骨长的差异显著( $P < 0.05$ ),骨指数的差异不显著;试验组股骨的骨强度差异极显著( $P < 0.01$ ),骨指数、骨长、骨强度的差异不显著;试验组肱骨的骨指数、骨长、骨密度差异显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ ),骨强度差异不显著(表 4)。根据图 1 可知,与对照组相比,试验组 Ihh 和 PTHrP 的 mRNA 水平下调,差异极显著( $P < 0.01$ );Col X mRNA 水平上调,差异极显著( $P < 0.01$ );Runx2、Col Ⅱ 表达变化不明显。

表 2 TD 评分、TD 发生率、体质量的变化

| 组别  | TD 评分           | TD 发生率 (%) | 体质量 (g)         |
|-----|-----------------|------------|-----------------|
| 对照组 | 0.11 ± 0.160    | 8.3        | 363.9 ± 65.5    |
| 试验组 | 1.56 ± 0.705 ** | 88.9 **    | 325.6 ± 62.4 ** |

注 同列数据后标有“\*\*”“\*”分别表示差异极显著( $P < 0.01$ )、显著( $P < 0.05$ )。表 3、表 4 同。

表 3 血液生化参数变化

| 组别  | 钙 (mmol/L)     | 碱性磷酸酶 (U/L)   | 磷 (mmol/L)     |
|-----|----------------|---------------|----------------|
| 对照组 | 2.64 ± 0.39    | 4 553 ± 1 451 | 2.11 ± 0.41    |
| 试验组 | 1.93 ± 0.20 ** | 3 900 ± 1 270 | 1.69 ± 0.35 ** |

3 结论与讨论

骨放射密度和断裂强度是评定骨质的重要指标,骨放射密度与骨断裂强度之间存在正相关关系<sup>[5]</sup>。自然条件下肉鸡 TD 发生率差异很大,为研究其发病机理,研究人员尝试多种方法建立该病的动物模型,例如通过遗传选育,改变日粮的钙磷比例或电解质平衡,在日粮中添加含硫氨基酸、霉菌毒素、福美双等<sup>[7-12]</sup>。上述方法中福美双诱导 TD 模型的方法在该病的研究中得到了广泛应用<sup>[13]</sup>,本试验采用福美双诱导建立肉鸡 TD 模型,结果显示,福美双诱导组肉鸡胫骨的骨长度、骨密度、骨强度均显著或极显著降低,骨骼生长异常,骨质脆弱,虽然试验组的胫骨、股骨、肱骨的骨指数有不同程度的增加,但骨强度呈现不同程度的下降趋势,表明福美双对长骨的软骨内成骨过程有抑制作用。本研究的结果表明,试验组血清中碱性磷酸酶活性未见显著变化,这与 Rath 等结论相异<sup>[14]</sup>。本研究中血钙、血磷含量降低可能是由于福美双对于肠道有破坏作用,影响了小肠对钙、磷的吸收进而造成的。

PTHrP-Ihh 信号通路是软骨内成骨中的关键调节通路<sup>[15]</sup>。Ihh 被证实参与胚胎肢芽的形成过程,是软骨细胞发育的促进因子<sup>[16]</sup>。PTHrP 是软骨细胞分化过程中不可缺少

表 4 骨参数变化

| 骨类别 | 组别  | 骨指数<br>(g/kg) | 骨长<br>(cm)    | 骨密度<br>(mm Al) | 骨强度<br>(N)   |
|-----|-----|---------------|---------------|----------------|--------------|
| 胫骨  | 对照组 | 5.04 ± 0.63   | 5.21 ± 0.24   | 2.12 ± 0.19    | 60 ± 13.1    |
|     | 试验组 | 5.17 ± 0.49   | 4.73 ± 0.31 * | 1.52 ± 0.22 ** | 51 ± 11.6 *  |
| 股骨  | 对照组 | 3.68 ± 0.31   | 3.49 ± 0.16   | 1.44 ± 0.23    | 80 ± 11.8    |
|     | 试验组 | 3.69 ± 0.24   | 3.39 ± 0.20   | 1.34 ± 0.16    | 59 ± 16.8 ** |
| 肱骨  | 对照组 | 2.39 ± 0.27   | 3.75 ± 0.24   | 1.99 ± 0.25    | 93 ± 18.5    |
|     | 试验组 | 2.70 ± 0.24 * | 3.60 ± 0.25 * | 1.56 ± 0.21 ** | 91 ± 11.5    |

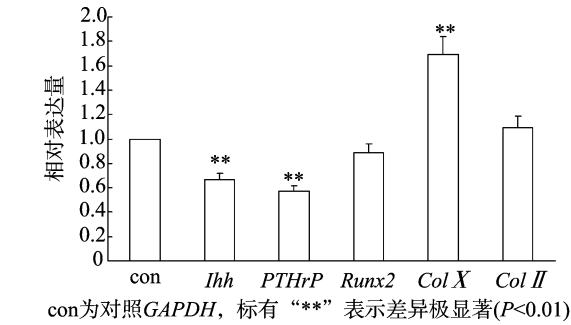


图1 TD 肉鸡生长板基因的表达变化

的限制性调节因子,主要受分泌性蛋白 *Ihh* 的调控,两者形成的 *PTHrP* - *Ihh* 信号轴相互作用,维持软骨细胞增殖、分化、凋亡过程的动态平衡<sup>[17]</sup>。有研究证明,*PTHrP* 通过下调 *Runx2* 的表达,间接下调 *Ihh* 的表达,进而抑制软骨的分化,且 *Runx2* 对 *Ihh* 的表达有促进作用<sup>[18]</sup>。本试验中 TD 肉鸡胫骨生长板 *PTHrP* mRNA 表达显著下降时,*Runx2* 的 mRNA 表达量未见明显变化,导致对 *Ihh* 的 mRNA 上调失败。*Ihh* 的 mRNA 表达量极显著下降,导致软骨细胞的增殖、软骨膜上成骨细胞的分化受阻,导致肉鸡 TD 的发生<sup>[16]</sup>。Ⅱ型胶原主要由肥大前软骨细胞分泌,X 型胶原由肥大软骨细胞分泌产生<sup>[19]</sup>。本试验中,肉鸡 TD 发生时,胫骨生长板 *Col II* 的 mRNA 无显著变化,而 *Col X* 的 mRNA 表达量显著升高,表明胫骨生长板软骨细胞可正常增殖,但分化为肥大软骨细胞后,不能进一步凋亡,被成骨细胞取代,完成软骨内成骨的过程,肥大软骨细胞在生长板下聚集,形成软骨栓。

参考文献:

[1] Talaty P N, Katanbaf M N, Hester P Y. Bone mineralization in male commercial broilers and its relationship to gait score [J]. Poultry Science, 2010, 89 (2) : 342 - 348.

[2] 李明辉, 郭风劲. 骨骺生长板 *PTHrP* - *Ihh* 信号轴及相关因子调节机制研究进展 [J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28 (6) : 348 - 350, 361.

[3] Edwards H J, Veltmann J R. The role of calcium and phosphorus in the etiology of tibial dyschondroplasia in young chicks [J]. The Journal of Nutrition, 1983, 113 (8) : 1568 - 1575.

[4] Manoli I, Alesci S, Blackman M R, et al. Mitochondria as key components of the stress response [J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2007, 18 (5) : 190 - 198.

[5] Hester P Y, Schreiweis M A, Orban J I, et al. Assessing bone mineral density in vivo: dual energy X - ray absorptiometry [J]. Poultry Science, 2004, 83 (2) : 215 - 221.

[6] Ranieri C, Fiorella D C, Patrizio C. Chondrocyte differentiation [J]. International Review of Cytology, 1995, 159 : 265 - 358.

[7] 罗江培, 朱连德, 王统石, 等. 酸化日粮对肉鸡胫骨软骨发育不良的影响及血液 pH 和血气的变化 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 24 (2) : 9.

[8] 王统石, 卢正兴, 朱连德, 等. 处于酸性环境中的肉鸡胫骨生长板软骨细胞发育周期时相 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 24 (7) : 6 - 8.

[9] 汪尧春, 周毓平, 吕于明, 等. 日粮不同阴阳离子对 21 日龄肉仔鸡血液酸碱平衡和胫骨软骨发育不良的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30 (3) : 20 - 25.

[10] 汪尧春, 周毓平. 日粮电解质平衡与肉鸡胫骨软骨发育不良 [J]. 中国畜牧杂志, 1999, 35 (1) : 49 - 50.

[11] 孙卫东, 王小龙. 饮水高氯诱发肉鸡胫骨软骨发育不良的试验研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31 (4) : 331 - 336.

[12] 涂广运. 福美双诱导条件下磷源和水平对肉鸡生产性能和胫骨质量的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.

[13] Edwards H M. Effects of thiuram, disulfiram and a trace element mixture on the incidence of tibial dyschondroplasia in chickens [J]. The Journal of Nutrition, 1987, 117 (5) : 964 - 969.

[14] Rath N C, Huff W E, Balog J M, et al. Comparative efficacy of different dithiocarbamates to induce tibial dyschondroplasia in poultry [J]. Poultry Science, 2004, 83 (2) : 266 - 274.

[15] 李明辉, 郭风劲. 骨骺生长板 *PTHrP* - *Ihh* 信号轴及相关因子调节机制研究进展 [J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28 (6) : 348 - 350, 361.

[16] McMahon A P, Ingham P W, Tabin C J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2003, 53 : 1 - 114.

[17] Chen X, Macica C M, Nasiri A, et al. Regulation of articular chondrocyte proliferation and differentiation by Indian hedgehog and parathyroid hormone - related protein in mice [J]. Arthritis and Rheumatism, 2008, 58 (12) : 3788 - 3797.

[18] Long F, Chung U I, Ohba S, et al. *Ihh* signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton [J]. Development, 2004, 131 (6) : 1309 - 1318.

[19] Iyama K, Ninomiya Y, Olsen B R, et al. Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification [J]. The Anatomical Record, 1991, 229 (4) : 462 - 472.