



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.026
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4083.shtml

· 简要论著 ·

层粘连蛋白在先天性巨结肠的表达及意义

周小琴¹, 牛丽文², 陶强²

(1. 南昌大学医学院研究生院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省儿童医院 外科, 江西 南昌 330006)

摘要

目的: 观察先天性巨结肠(HD)不同节段肠壁层粘连蛋白(LN)的表达, 探讨LN与HD发病的关系。
方法: 收集30例手术切除HD标本, 分别行LN免疫组化研究和实时荧光定量PCR, 观察其分布情况, 并行统计学处理。

结果: LN染色面积及染色强度从狭窄段到正常段依次减弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$); LN基因在狭窄段的表达是正常段的2.15倍, 其表达水平狭窄段 > 移行段 > 正常段。

结论: HD中LN的分布出现异常, 是HD发病的重要原因。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1433-1436]

关键词

Hirschsprung病/病因学; 层粘连蛋白; 儿童, 学龄前
中图分类号: R656.9

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)是新生儿常见的消化系统疾病, 占消化道畸形的第2位, 发病率为1/5 000, 男多于女^[1]。HD的发病机制尚无定论, 一些学者认为HD的形成是因为肠道神经嵴细胞的异常迁移及死亡^[2-3], 另一些学者则认为细胞外基质如层粘连蛋白(Laminin, LN)的异常表达才是HD发病的根本原因^[4]。本

研究通过免疫组化及实时荧光定量PCR等方法观察分析LN在HD不同节段的表达, 以探讨LN与HD发病的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

标本来自江西省儿童医院普外科30例经病理证实为HD的患儿(各段定义以术中观察病变段及术后病理分析所得), 年龄4个月至5岁, 平均1.3岁(其中2例<6月), 体质量4.3~19.5 kg, 平均11.6 kg, 身高52.5~114.5 cm, 平均74.8 cm。取新鲜标本保存于-80℃冰箱, 用于实时荧光定

基金项目: 江西省重大攻关计划资助项目(20094010)。

收稿日期: 2014-07-09; **修订日期:** 2014-09-04。

作者简介: 周小琴, 南昌大学医学院研究生院硕士研究生, 主要从事小儿普通外科方面的研究。

通信作者: 牛丽文, Email: niuliwen1969@126.com

- [16] 张美云, 杨永岩, 王新花, 等. Bcl-2、PD-L1在大肠癌组织中的表达及意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2012, 43(6):827-829.
- [17] 邹瀛波, 郭伟, 蒋耀光. 野生型p53诱导基因1研究进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(5):538-540.
- [18] 迟元卫, 陈健, 刘亮, 等. 结肠癌中hTERT和P53蛋白表达及临床意义[J]. 山东大学学报: 医学版, 2011, 49(4):115-117.
- [19] Garimella V, Hussain T, Agarwal V, et al. Clinical response to primary letrozole therapy in elderly patients with early breast cancer: possible role for p53 as a biomarker[J]. Int J Surg, 2014, 12(8):821-826.
- [20] Baspinar S, Bircan S, Orhan H, et al. The relation of beclin 1 and bcl-2 expressions in high grade prostatic intraepithelial neoplasia and

prostate adenocarcinoma: a tissue microarray study[J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(7):412-418.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 张海洋, 厉冰, 杨玉兵, 等. 大肠癌中抑制基因BCL-2、p53与Beclin-1的表达及其与肠癌生物学行为的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1429-1433. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.025

Cite this article as: ZHANG HY, LI B, YANG YB, et al. The relationship of expression of the suppressor genes BCL-2, p53 and Beclin-1 with biological behavior in colorectal carcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(10):1429-1433. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.025

量 PCR。另取新鲜标本甲醛固定，石蜡包埋，用于免疫组化。鼠抗人 LN 单克隆抗体、二步法免疫组化检测试剂 PV-9000、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司；实时荧光定量 PCR 试剂购自长城生物科技公司。

1.2 引物设计与合成

以 β -actin 为内参基因，产物 285 bp；LN 依其 α 链设计一对引物，产物 118 bp。均由 invitrogen 公司合成并纯化。 β -actin 上游引物：5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3'；下游引物：5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3'。LN 基因上游引物：5'-CAC ATG TCC GTC ACA GTG GA；下游引物：5'-CCC CGA CGT AGA AGA CGA AG-3'。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 标本经 10% 中性甲醛固定，常规石蜡包埋，每一蜡块连续切片 2 张（片厚 4 μ m），分别作 HE 染色、鼠抗人 LN 免疫组化。免疫组化采用 SP 法，常规脱蜡、水化，胰酶修复抗原，3% H_2O_2 孵育 10 min，阻断内源性过氧化酶。滴加一抗（浓度 1:100），4 $^{\circ}C$ 冰箱过夜。二抗采用 PV-9000 试剂盒，DAB 显色剂显色，苏木素复染，封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (1) 提取 RNA：标本各段组织分别提取 RNA，并做光密度值检测；(2) 合成 cDNA：采用 20 μ L 反应体系，42 $^{\circ}C$ 孵育 30 min，85 $^{\circ}C$ 加热 5 min，快速离心；(3) 实时

荧光定量 PCR：采用 50 μ L 反应体系，包括 cDNA 样品 10 μ L，带有 ROX 的 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 25 μ L，上、下游引物各 1 μ L，高压灭菌蒸馏水补足 50 μ L。反应条件为：50 $^{\circ}C$ 2min，95 $^{\circ}C$ 2 min，95 $^{\circ}C$ 15 s，55 $^{\circ}C$ 30 s，72 $^{\circ}C$ 30 s，共 45 个循环。7500 型 SDS 应用软件自动分析，给出扩增曲线和 Ct 值。

1.3.3 结果判定 (1) 观察层粘连蛋白在肠管分布的位置及强度，利用 Image-Pro Plus6.0 软件对 LN 染色切片进行平均吸光度值和吸光面积检测和定量分析；(2) 实时荧光定量 PCR 每样本重复 3 次，取其平均值为 Ct 值。计算各段各基因的平均 Ct 值，采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较各基因的表达差异， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值即为目的段较正常段基因表达的倍数（以扩张段做正常对照）^[5]。

1.4 统计学处理

SPSS 13.0 软件对结果进行统计学分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验， $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下 HE 染色

正常段肠壁结构完整清晰，神经丛丰富，丛内可见大量神经节细胞；狭窄段神经节细胞缺如，神经纤维增生，紊乱，形态扭曲（图 1-2）。

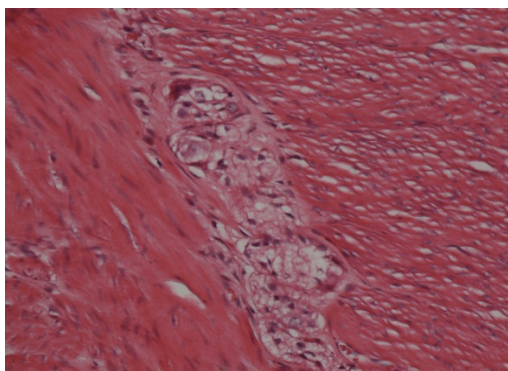


图 1 正常组 HE 染色（ $\times 100$ ） 肠壁各层组织结构完整，染色清晰

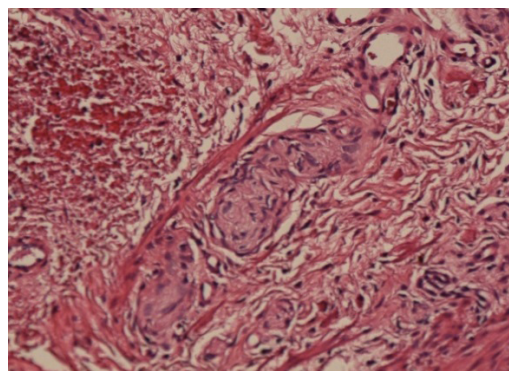


图 2 狭窄段 HE 染色（ $\times 100$ ） 神经纤维紊乱，形态扭曲

2.2 镜下免疫组化

可见棕黄色颗粒，主要分布在黏膜层、黏膜下层，环肌层数量较少。狭窄段多为连续性黄染（图 3），正常段染色多为点状或线状（图 4）。染色面积从

狭窄段到正常段依次减弱（表 1）；染色强度也依次减弱（表 2）。狭窄段与正常段比较，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

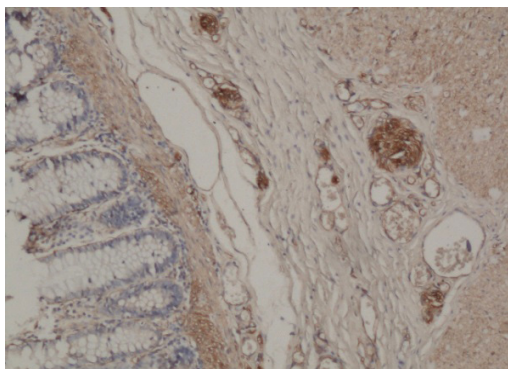


图 3 狭窄段 LN 染色 (×400) 阳性反应细胞大部分聚集在黏膜下层, 染色深

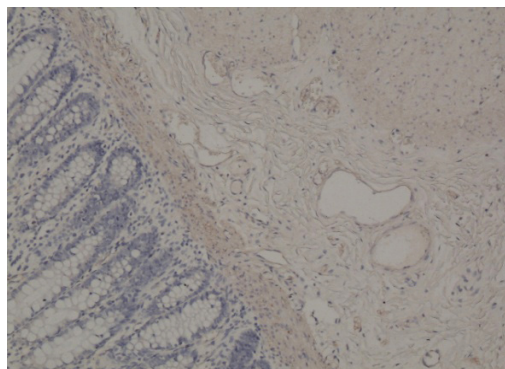


图 4 正常段 LN 染色 (×400) 阳性反应细胞多呈点状, 染色浅

表 1 层粘连蛋白在 HD 不同肠段免疫组化平均染色面积 ($\bar{x} \pm s$)

组织	平均染色面积	t (与扩张段比较)	P (与扩张段比较)
正常段	12.16 ± 2.56	—	—
移行段	17.75 ± 3.18	2.733	0.014
狭窄段	22.21 ± 3.04	2.375	0.029

表 2 层粘连蛋白在 HD 不同肠段免疫组化平均吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

组织	平均吸光度值	t (与扩张段比较)	P (与扩张段比较)
正常段	0.034 ± 0.12	—	—
移行段	0.047 ± 0.24	2.273	0.036
狭窄段	0.061 ± 0.03	2.378	0.029

2.3 实时荧光定量 PCR

提取的 RNA 光密度值测定 A_{260}/A_{280} 值均在 1.8~2.0 之间。系统自动分析得出扩增曲线, 各样

品重复性较好, 溶解曲线较一致, TM 值为 88℃。LN 基因在狭窄段的表达是正常段的 2.15 倍, 其表达水平狭窄段 > 移行段 > 正常段 (表 3)。

表 3 LN 基因在先天性巨结肠不同节段的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组织	LN 基因平均 Ct 值	β -actin 基因平均 Ct 值	Δ Ct 值	$\Delta\Delta$ Ct 值	基因表达倍数 (相对扩张段)
正常段	30.44 ± 3.51	29.86 ± 3.36	0.58	0	1
移行段	30.86 ± 2.79	30.61 ± 4.12	0.25	-0.33	1.26
狭窄段	29.97 ± 3.16	30.47 ± 2.30	-0.5	-1.08	2.15

3 讨论

肠神经系统 (ENS) 起源于神经嵴细胞, 可调节胃肠道的运动、分泌、吸收等功能, 对维持肠道的正常功能具有重要的意义^[3]。而神经嵴细胞的迁移、增殖和分化则受肠间质分泌的信号传导分子的控制, 包括胶质细胞源性神经营养因子、内皮素 3 信号通路和细胞外基质分子, 如层粘连蛋白^[6]。层粘连蛋白是一种异三聚体糖蛋白, 由 α 、 β 、 γ 3 条肽链组成, 外形似十字架, 是基膜特有的非胶原糖蛋白^[7]。作为细胞外基质的重要成分, LN 能特异地与细胞膜表面受体结合, 改变细胞内部结构和肌动蛋白分子的排布, 从而使细胞定向迁移、分裂和增殖, 促进肠道神经细胞的分化、发育、成熟和定居^[8]。此外, LN 还是肠道基底膜的主要

组成成分, 对平滑肌的发育起重要作用^[9]。

HD 是一种常见的先天性疾病, 其发病机制尚无定论。有学者^[10-12]认为 LN 的异常与 HD 发病密不可分, 他们利用 HD 老鼠模型进行实验, 观察到在无神经节细胞段细胞外基质异常堆积, 层粘连蛋白和 IV 型胶原在基底膜环肌层免疫荧光染色与对照组相比强度明显增加, 并且这些异常都出现在神经嵴细胞迁移之前。在本实验中笔者观察到, 狭窄段 LN 免疫组化染色呈片状, 且染色面积和染色强度均明显超过正常段, 而实时荧光定量 PCR 的结果则显示 LN 基因表达水平狭窄段 > 移行段 > 正常段, 这与以往的研究结果相同。由此, 笔者认为 (1) LN 数量的增加导致了 HD 患儿平滑肌 LN 染色的增强; (2) LN 的异常增高发生在神经嵴细胞迁移之前, 证明这些病变是 HD 的病因而非结果;

(3) 大量的 LN 集聚在无神经节细胞肠段的细胞外间隙中, 阻碍了神经节细胞的迁移; (4) LN 基因的正常表达, 从组织条件上过早的促进肠道神经细胞的分化、发育和定居, 造成神经节细胞的缺如, 最终导致 HD。

综上所述, LN 在无神经节细胞肠段的异常表达与 HD 的发病密切相关, 但 LN 的病变是否是最主要的致病因素, 是否有其他基因或蛋白参与发病机制, 尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kenny SE, Tam PK, Garcia-Barcelo M. Hirschsprung's disease[J]. *Semin Pediatr Surg*, 2010, 19(3):194-200.
- [2] Anderson RB, Stewart AL, Young HM. Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 323(1):11-25.
- [3] Wang X, Chan AK, Sham MH, et al. Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3):992-1002.
- [4] Parikh DH, Tam PK, Lloyd DA, et al. Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease[J]. *J Pediatr Surg*, 1992, 27(8):991-995.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [6] Bates MD. Development of the enteric nervous system[J]. *Clin Perinatol*, 2002, 29(1):97-114.
- [7] Miner JH, Yurchenco PD. Laminin function in tissue morphogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20:255-284.
- [8] 李爱武, 张文同, 刘春喜, 等. 先天性巨结肠层粘连蛋白的表达及与 RET 基因相关性的研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27(5):237-240.
- [9] Bolcato-Bellemin AL, Lefebvre O, Arnold C, et al. Laminin $\alpha 5$ chain is required for intestinal smooth muscle development[J]. *Dev Biol*, 2003, 260(2): 376-390.
- [10] Alpy F, Ritié L, Jaubert F, et al. The expression pattern of laminin isoforms in Hirschsprung disease reveals a distal peripheral nerve differentiation[J]. *Human Pathology*, 2005, 36(10):1055-1065.
- [11] Lane PW. Association of megacolon with two recessive spotting genes in the mouse[J]. *J Hered*, 1966, 57(1):29-31.
- [12] Payette RF, Tennyson VM, Pomeranz HD, et al. Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of *ls/ls* mutant mice[J]. *Dev Biol*, 1988, 125(2):341-360.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 周小琴, 牛丽文, 陶强. 层粘连蛋白在先天性巨结肠的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(10):1433-1436. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.026

Cite this article as: ZHOU XQ, NIU LW, TAO Q. The expression of laminin in Hirschsprung's disease and its implication[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(10):1433-1436. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.10.026

欢迎订阅《中南大学学报(医学版)》

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》, 创刊于 1958 年, 为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。该刊已被美国医学文献分析和联机检索系统(Medline, Pubmed)及其《医学索引》(IM)、荷兰《医学文摘》(EM)、美国《化学文摘》(CA)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)、中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)等国内外多家重要数据库和权威文摘期刊收录; 是中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊及中国期刊方阵“双效”期刊; 为“第 2 届、第 3 届中国高校精品科技期刊”、“2008 年中国精品科技期刊”和湖南省“十佳科技期刊”。

本刊为月刊, 国际标准开本(A4 幅面), 每月月末出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷。定价 20 元/册, 全年 240 元。国内外公开发售。国内统一刊号: CN43-1427/R, 国际标准刊号: ISSN 1672-7347; 国内邮发代号: 42-10, 国外邮发代号: BM422; 欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅, 漏订或需增订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

地址: 湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 75 号信箱 邮编: 410078

电话: 0731-84805495, 0731-84805496 传真: 0731-84804351

Email: xyxb2005@vip.163.com, xyxb2005@126.com

Http://www.csumed.org; www.csumed.com; www.csumed.net

http://xbyx.xysm.net

中南大学学报(医学版)编辑部