

文章编号:1673-5501(2008)05-0333-07

胶质细胞源性神经营养因子、Cajal 间质细胞和 缝隙连接蛋白 43 在先天性巨结肠中的表达分布研究

王宝西 侯 豫 杨 烨

摘要 目的 探讨胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)mRNA、Cajal 间质细胞(ICC)及缝隙连接蛋白 43(Cx43)与先天性巨结肠(HD)发病的关系。**方法** 依据纳入和排除标准选择 2006 年 8 月~2007 年 9 月经病理诊断为 HD 的患儿,取手术切除结肠标本作为 HD 组,根据取材位置不同分为狭窄段(又分为短段型和常见型)、移行段和扩张段亚组。应用半定量 RT-PCR 及免疫组化技术检测结肠组织 GDNF mRNA 水平和 ICC、Cx43 的分布,以肠套叠患儿手术结肠标本作为对照组。**结果** 研究期间 HD 组纳入 42 例,对照组纳入 5 例。①狭窄段亚组 GDNF mRNA 表达较扩张段亚组和对照组明显降低($P < 0.05$);扩张段亚组和对照组 GDNF mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。狭窄段亚组中短段型较常见型 GDNF mRNA 表达低($P < 0.05$)。② ICC 在对照组和扩张段亚组主要分布于黏膜下丛和肌间丛,呈现连续性分布,相互连接形成网络状结构。ICC 在狭窄段亚组结肠组织内的分布显著减少或消失,与对照组和扩张段亚组差异有极显著统计学意义($P < 0.001$),肌间丛的网络状结构完全破坏,残存 ICC 形态异常;移行段亚组结肠组织内 ICC 的分布较对照组和扩张段亚组减少($P < 0.05$),但较狭窄段亚组显著增加($P < 0.001$),其形态部分接近正常,但肌间丛缺乏连续性分布,未能形成正常的网络状结构。③狭窄段亚组肠壁肌层内 Cx43 表达缺失,各层中几乎未见 Cx43 表达。移行段亚组肠壁环肌层与纵肌层交界处 Cx43 有中等强度表达。扩张段亚组肠壁环肌层与纵肌层交界处 Cx43 呈强阳性分布,黏膜下丛和肌间丛未见或少见 Cx43 表达。**结论** GDNF mRNA 表达异常、ICC 分布减少和形态异常、Cx43 表达缺失或减少和缝隙连接结构的破坏可能引起细胞间物质和电信号的传递障碍,而导致 HD 发病的原因之一。

关键词 胶质细胞源性神经营养因子; 先天性巨结肠; RT-PCR; Cajal 间质细胞; 缝隙连接蛋白 43; 免疫组织化学

Expression and distribution of glial cell derived neurotrophic factor, interstitial cells of Cajal and Connexin 43 in Hirschsprung's disease

WANG Bao-xi, HOU Yu, YANG Ye(Department of Pediatrics, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Corresponding Author: WANG Bao-xi, E-mail: erkewbx@fmmu.edu.cn

Abstract Objective To investigate the relationship between the gene expression of GDNF and the distribution of interstitial cells of Cajal(ICC), Connexin 43(Cx43) and the mechanism of development of Hirschsprung's disease (HD).
Methods Forty-two pairs of full thickness specimens(aganglionic segments and ganglionic segments)were from Hirschsprung's disease patients diagnosed pathologically, immediately after operation. Another five colon specimens were obtained from intussusception patients as control. The GDNF mRNA expression and the distribution of ICC, Cx43 were detected in different parts of HD segments.
Results ① GDNF mRNA expression in the aganglionic segments were decreased, compared with the ganglionic segments and the control group($P < 0.05$). There were no statistical differences in GDNF mRNA expression between control group and the ganglionic segments group. Of all the aganglionic segments group, GDNF mRNA expression in short segment aganglionosis group were less than that in long segment-type Hirschsprung's disease group($P < 0.05$). There were no statistical differences of GDNF mRNA expression in dilated segment between long segment-type and short segment-type group. ② ICC were mainly distributed in submucosal plexus (IC-SM) and myenteric plexus (IC-MY) of the distal colon, and also distributed in circular muscle layer and longitudinal muscle layer (IC-LM). IC-MY were distributed continuously between the circular and longitudinal

作者单位 第四军医大学唐都医院儿科 西安,710038

通讯作者 王宝西, E-mail: erkewbx@fmmu.edu.cn

muscle layers and formed a network; (2). In the segments of HD, ICC were decreased obviously in aganglionic segments group ($P < 0.001$) compared with the control group. The IC-MY network was disappeared, and the configuration of the residual ICC was abnormal. In the transitional zone group, ICC were reduced than those of ganglionic segments group and the control group ($P < 0.05$), but were more than those of the aganglionic segments group ($P < 0.001$). Their configuration was close to normal, but the IC-MY did not form a normal network. There was no difference in the distribution of ICC between ganglionic segments group and the control group ($P > 0.05$). ③ There was no immunoreactivity of Cx43 in the muscle layers of aganglionic segment in HD, which had significant difference in Cx43 expression between ganglionic segment of HD and normal bowels. Moderate immunostaining of Cx43 was observed at the circular muscle and the region between the circular and longitudinal layer in migratory segment from patients with HD, which had significant difference in Cx43 expression between ganglionic and aganglionic segment of HD. Moderate to strong immunostaining of Cx43 was observed at the circular muscle and the region between the circular and longitudinal layer in ganglionic segment from patients with HD and in normal bowels. There was no significant difference in Cx43 expression between ganglionic segment of HD and normal bowels. **Conclusions** The abnormal expression of GDNF mRNA, the decrease and paramorphia of ICC, the lack of expression of Cx43 in the aganglionic bowel of HD and the destruction of the gap junction indicated that the impaired intercellular substance exchange. The disorder of intercellular communication between cells might partly be responsible for the motility dysfunction in HD.

Key words Glial cell derived neurotrophic factor; Hirschsprung's disease; RT-PCR; Interstitial cells of Cajal; Connexin 43; Immunohistochemistry

先天性巨结肠 (hirschsprung's disease, HD) 系肠神经系统先天性异常疾病, 为新生儿期低位肠梗阻的常见原因之一。其病因尚不明确, 目前大多认为是遗传及环境多种因素综合作用和共同调控的结果^[1]。以往对受体酪氨酸激酶基因 (RET 原癌基因) 研究较多, 近来发现胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell derived neurotrophic factor, GDNF) 基因及其编码产物 GDNF 与 HD 发病有密切的关系, GDNF 和其受体 (GFR) 结合后方可与 RET 基因编码的酪氨酸激酶受体结合, 激活酪氨酸激酶, 继之使细胞内靶蛋白磷酸化, 传递与细胞生长分化、增殖和凋亡有关的信号。Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 广泛分布于消化道, 是胃肠慢波活动的起搏细胞及维持基本电节律的主要传播细胞, 并参与胃肠道神经信息的传递。

近年有研究表明, ICC 与众多胃肠道疾病关系密切, 其分布异常、数目减少可能是这些疾病发病的重要病理生理机制之一。缝隙连接 (gap junction, GJ) 是相邻 2 个细胞之间的连接通道排列而成的一种特殊膜结构, 相邻细胞通过 GJ 进行信息、能量和物质的交换, 参与细胞间物质和电信号的传递^[2]。其中连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 是人类主要细胞 GJ 蛋白, 其表达的异常与多种疾病的发生有关^[3]。

本研究拟采用 RT-PCR 及免疫组化方法检测 GDNF mRNA、ICC 和 Cx43 在 HD 患儿正常及病变肠段肠壁内的表达和分布, 探讨 GDNF、Cx43、ICC 与 HD 发病的关系, 为 HD 病因的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 纳入标准 ①临床诊断 HD 的患儿; ②经直肠黏膜活

检, 苏木精-伊红染色光镜下未发现神经节细胞作为诊断 HD 的金标准; ③HD 手术患儿; ④对照组选取肠套叠手术患儿; ⑤手术中患儿或家长同意留取手术标本用于实验研究。

1.2 分组和组织制备 ①HD 组: 患儿手术时留取狭窄段 (无神经节细胞肠段) (狭窄段亚组)、移行段 (移行段亚组) 和扩张段 (神经节细胞正常肠段) (扩张段亚组) 全层肠组织各 1 cm³, 迅速放入焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的冻存管并存放于液氮中 (-170°C) 保存, 同时留取相同部位的肠组织用多聚甲醛固定, 行组织病理学及免疫组化检查, 神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 及 S-100 免疫组化染色, 证实符合 HD 诊断且取材正确^[4]; ②对照组: 留取肠套叠患儿结肠非病变处组织, 分别用液氮 (-170°C) 保存和多聚甲醛固定。

1.3 试剂与仪器 Trizol 提取液 (美国 Invitrogen 公司), RT-PCR 试剂盒 (美国 Fementas 公司), DEPC (美国 Sigma 公司), PCR 引物 (上海生工公司合成), Lampda35 UV-VIS 紫外分光光度计 (美国 Perkin Elmer 公司), 低温高速离心机 (德国 Heraeus 公司), PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), 凝胶成像系统 (美国 UVP GPS8006)。免疫组化: ICC: 一抗为兔抗人 c-Kit (C-19, 美国 Santa Cruz), 二抗为羊抗鼠/兔 IgG (KIT9901, 中国福州迈新); Cx43: 一抗为兔抗人 Cx43 多克隆抗体 (1:50, 美国 Zymed 公司), 用 PBS 代替一抗做阴性对照。其他常规试剂由第四军医大学唐都医院中心实验室提供。

1.4 GDNF mRNA 的表达

1.4.1 总 RNA 的提取 液氮研磨法: 取液氮冻存肠管组织 50~100 mg, 加入 DEPC 处理过的冷却研磨器内, 研磨时

添加液氮保持组织处于固体状态,研磨至粉末状后待液氮完全挥发,将粉末加入含有1 mL Trizol 提取液预冷的1.5 mL EP管中,摇匀静置10 min;加200 μ L 氯仿溶液混匀、离心(1 200 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)、取上清,异丙醇沉淀,750 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇(DEPC水稀释)洗涤,RNA纯度和浓度用紫外分光光度计测定, A_{260}/A_{280} 为1.8~1.9,总RNA在20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶上进行电泳,可见28 s、18 s和5 s条带,观察到28 s条带的亮度约是18 s的2倍,说明总RNA有较好的完整性。加DEPC水使RNA终浓度为1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, -70 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

1.4.2 引物设计 引物用软件Primer5.0设计。

GDNF的引物序列为:

上游引物:5'-GATACATCCACACCTTTTAGCGG-3'

下游引物:5'-ATGAAGTTATGGGATGTCGTGGC-3'

预期扩增片段为633 bp;

内参-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)引物序列为:

上游引物:5'-GGGTCTGAACCATGAGAAGTATG-3'

下游引物:5'-CCATCACGCCACAGTTTCG-3'

预期扩增片段为171 bp。

1.4.3 RT-PCR 按Fementas RT-PCR试剂盒说明书的操作步骤,对提取的mRNA进行逆转录,反应体系为:RNA模板2 μ L, Oligo dT 1 μ L, 5 \times buffer 5 μ L, Ribalock 抑制剂1 μ L, 逆转录酶1 μ L, 脱氧核苷三磷酸(dNTP) 2 μ L, 无RNA酶水(RNase free H₂O)调整总体积至20 μ L, 70 $^{\circ}$ C 5 min, 37 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min。PCR体系:GDNF引物1 μ L, cDNA 1 μ L, GADPH引物1 μ L, dNTP 1.5 μ L, Taq酶0.5 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, MgCl₂ 1.5 μ L, RNase free H₂O调整总体积为25 μ L。PCR扩增条件:94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。PCR产物5 μ L上样于20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳,电压100 V, 40 min, 应用凝胶成像系统对电压结果成像并检测各电泳条带A值,结果用公式表示:

$$\text{GDNF mRNA 的相对含量} = A_{\text{GDNF}} / A_{\text{GADPH}}$$

PCR扩增在633 bp处有亮带出现者为GDNF mRNA表达阳性,无亮带出现者为GDNF mRNA表达阴性。

1.5 免疫组化染色

1.5.1 ICC在HD不同肠段的分布 将固定、石蜡包埋的标本制成5 μ m厚的切片,贴在经AES处理的载玻片上,石蜡切片经二甲苯脱蜡10 min \times 2; 100% ~ 95% ~ 90% ~ 80% ~ 70%乙醇各5 min, 入水; 0.3% 甲醇-H₂O₂室温孵育30 min, 封闭内源性过氧化物酶; 0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS(pH 7.4)漂洗10 min \times 3; 抗原修复标本于柠檬酸缓冲液(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.0)微波炉加热10~15 min; 1% 正常羊血清30 min, 封闭背景; 吸去多余血清, 加1:50一抗, 4 $^{\circ}$ C冰箱

孵育过夜; PBS漂洗8 min \times 3; 1:100生物素标记的羊抗兔IgG, 室温孵育2 h; PBS漂洗8 min \times 3; 新鲜配制1:100 DAB溶液, 显微镜下观察2~3 min; PBS漂洗8 min \times 3, 蒸馏水5 min; 水洗, 脱水、透明, DPX封片, 镜检。

每张切片取10个高倍镜视野下的阳性细胞计数, 取其平均值计算 \bar{x} 及s。免疫组化对照实验: 分别以0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS和正常山羊血清替代一抗进行孵育作为空白对照和替代对照。

1.5.2 Cx43表达分布 Cx43分布染色使用一抗为兔抗人Cx43多克隆抗体, 二抗与ICC染色相同。

1.6 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 多重比较采用LSD-t检验; 两个样本均数间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每张切片取10个高倍镜视野下的阳性细胞计数, 取其平均值计算 $\bar{x} \pm s$ 。采用SPSS 11.5软件进行统计分析。

2 结果

2006年8月至2007年9月西安市儿童医院、第四军医大学唐都医院收集符合本研究纳入标准的HD患儿42例, 男33例, 女9例, 年龄2个月至10岁。手术采用改良Swenson法或Duhamel法, 对新生儿和小婴儿短段型HD使用经肛门脱出巨结肠根治术。其中1例合并回肠闭锁, 2例合并先天性肠扭转不良。

对照组5例, 男4例, 女1例, 年龄30 d至8岁。

2.1 GDNF mRNA的表达 各组标本中, PCR扩增出目的阳性带的比例不同。狭窄段亚组GDNF mRNA表达低于扩张段亚组和对照组($t = 5.26, P < 0.01$); 扩张段亚组和对照组GDNF mRNA表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。狭窄段亚组中短段型GDNF mRNA表达低于常见型($t = 11.29, P < 0.05$) (图1, 表1, 2)。

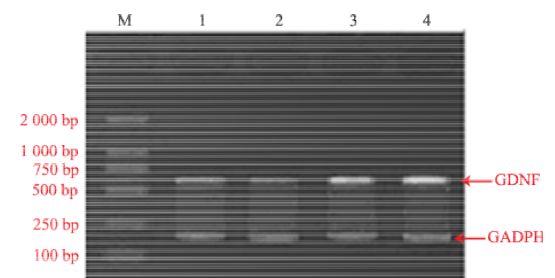


图1 不同肠管GDNF和GADPH的表达

Fig 1 The expression of GDNF and GADPH in different segments

Notes: M: Marker; 1: Aganglionic segments of long segment-type HD; 2: Aganglionic segments of short segment HD; 3: Ganglionic segments; 4: Control

表1 GDNF mRNA 在 HD 组和对照组的表达

Tab 1 The expression of GDNF mRNA in different segments of HD

| Group | n | Positive [n(%)] | Relative amount of mRNA/ $\bar{x} \pm s$ |
|--------------|----|------------------|--|
| Control | 5 | 5(100) | 1.29 ± 0.24 |
| HD | | | |
| Aganglionic | 42 | 11(26.2) | 0.69 ± 0.15 |
| Ganglionic | 42 | 40(95.2) | 1.13 ± 0.38 |
| Transitional | 42 | 15(35.7) | 0.87 ± 0.23 |
| F | | | 15.96 |
| P | | | <0.05 |

Notes: Comparing all the four groups, $F=15.96, >F_{0.01}(3,38), P < 0.01$. There were significant differences between the aganglionic segments group and the aganglionic segments group or the control group ($t=5.26, P < 0.001$)

表2 HD 狭窄段短段型和常见型 GDNF mRNA 表达

Tab 2 The expression of GDNF mRNA in aganglionic segments group in different types of HD

| Group | n | Positive [n(%)] | Relative amount of mRNA/ $\bar{x} \pm s$ |
|---------------|----|------------------|--|
| Short segment | 12 | 4(33.3) | 0.67 ± 0.47 |
| Normal type | 30 | 7(23.3) | 0.84 ± 0.53 |

Notes: There were significant differences between the two groups ($t=11.29, P < 0.05$)

2.2 ICC 在 HD 不同肠段的分布

2.2.1 对照组与扩张段亚组的结肠组织 ICC 分布和形态相似,无明显差别(表3)。主要分布在黏膜下丛(IC-SM)和肌间丛(IC-MY),在环肌层(IC-CM)和纵肌层(IC-IM)也有分布。肌间丛在切面上呈连续性分布,相互连接形成网络状结构。正常 ICC 多呈纺锤形,有 2~5 条长突

起,可见部分突起与自主神经末梢和平滑肌细胞关系密切;核大,核周胞质少(图 2A,B)。

2.2.2 移行段亚组结肠组织 ICC 形态基本正常,但未能形成正常的网络状结构,呈不连续分布的 ICC,数目较对照组减少($P < 0.05$) (图 2C,表 3)。

2.2.3 狭窄段亚组结肠组织 ICC 主要分布较对照组明显减少(表 3),残存 ICC 主要分布于肌间丛,形态异常,表现为突起变短、变钝,ICC 网络状结构受到破坏,很少见到连续分布的 ICC(图 2D)。有 2 例标本狭窄段 ICC 分布基本正常。

2.3 Cx43 在 HD 不同肠段的分布

2.3.1 HD 组肠壁内 Cx43 的分布 狭窄段亚组肠壁各层中未见 Cx43 的表达(图 3A)。扩张段亚组肠壁环肌层和纵肌层交界处 Cx43 呈强阳性分布(图 3B),移行段亚组肠壁环肌层和纵肌层交界处可见 Cx43 中等强度阳性分布(图 3C),黏膜下层和纵肌层未见或少见 Cx43 表达。

表3 HD 和对照组肠管 ICC 计数的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The number of ICC in different segments($\bar{x} \pm s$)

| Group | n | ICC counts |
|-------------------|----|--------------|
| Control | 5 | 12.87 ± 4.87 |
| HD | | |
| Aganglionic | 42 | 0.21 ± 0.75 |
| Transitional zone | 42 | 7.6 ± 1.32 |
| Ganglionic | 42 | 11.13 ± 3.54 |
| F | | 245.37 |
| P | | <0.001 |

Notes: There were significant differences in multiple comparison of the number of ICC in each group ($P < 0.001$) and no significant differences between the aganglionic group and the control group ($P = 0.548$). There were significant differences between the transitional zone and other two groups ($P < 0.001$)

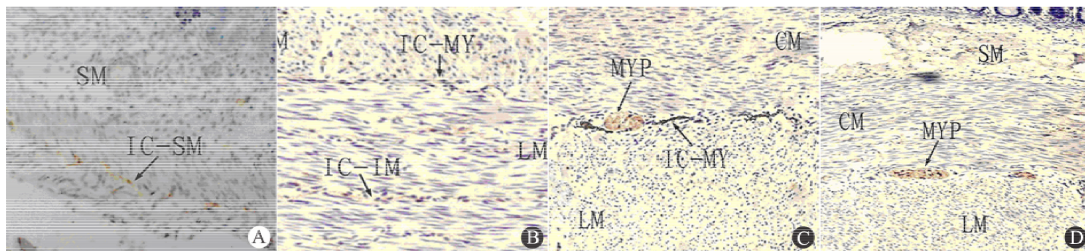


图2 ICC 在 HD 不同肠段的分布(c-Kit, x200)

Fig 2 The distribution of ICC in different segments of HD(c-Kit, x200)

Notes: A: HD ganglionic segments group IC-SM; B: Control group, IC-MY, normal ICC mostly showed spindle-shaped, there were 2 to 5 long processes, a part of processes were closely associated with autonomic nerve endings and smooth muscle cells; big nuclei and less cytoplasm around; C: HD transitional zone group, IC-MY and ICC were with almost normal appearance, but did not form a normal network; D: HD aganglionic segments group, the survival ICC were mainly distributed in IC-MY, with abnormal appearance, short and blunt processes, destroyed ICC network, less continuously distributed ICC

2.3.2 对照组结肠肠壁内 Cx43 的分布 Cx43 在正常结肠肠壁内分布主要位于环肌层和纵肌层交界处,纵肌层偶见阳性细胞分布,与 HD 扩张段亚组肠壁分布相似(图 3D)。对照组及扩张段亚组肠壁肌间层、环肌层 Cx43 的表达明显强于黏膜下层。

2.3.3 肠肌层内 Cx43 的半定量分析 对照组及 HD 组环肌层和纵肌层交界处 Cx43 的半定量分析显示(表 4),HD 组狭窄段亚组肠壁肌层内 Cx43 的表达与对照组和扩张段亚组差异均有显著统计学意义(t 分别为 6.457 和 5.357, P 均 <0.01);对照组与扩张段亚组 Cx43 表达差异无统计学意义($t=1.346, P>0.05$);扩张段、狭窄段亚组与移行段亚组 Cx43 表达差异有极显著统计学意义(t 分别为 3.580 和

4.371, P 均 <0.001)。

表 4 Cx43 在 HD 组和对照组环肌层和纵肌层交界处的表达($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The expression of Cx43 in different segments of HD ($\bar{x} \pm s$)

| Group | n | Positive cells |
|-------------------|----|----------------|
| Control | 5 | 58.32 ± 6.17 |
| HD | | |
| Ganglionic | 42 | 53.85 ± 5.30 |
| Transitional zone | 42 | 16.26 ± 3.69 |
| Aganglionic | 42 | 1.40 ± 1.17 |

Notes: One-Way ANOVA was used in statistical analysis, $F=466.542, P<0.001$

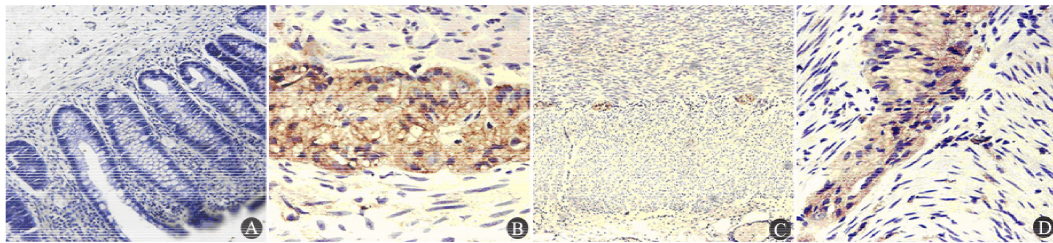


图 3 Cx43 在 HD 不同肠段的表达(Cx43, $\times 200$)

Fig 3 The expression of CX43 in different segments of HD(Cx43, $\times 200$)

Notes: A: HD aganglionic segments group, no Cx43 expression was found in the layer of intestine wall; B: HD ganglionic segments group, Cx43 expression was strongly positive in the junction of IC-IM of intestine wall; C: HD transitional zone group, Cx43 expression was moderately positive in the junction of IC-IM of intestine wall; D: Control group, Cx43 was mainly distributed in the junction of IC-IM in the normal lowles(external circular muscle), less positive cells were distributed in IC-IM, similar to that in HD ganglionic segments group

3 讨论

HD 主要病变为肠道末端一段肠壁的肠神经丛神经节细胞缺失,受累肠段持续异常收缩;其上段结肠仍然保持蠕动功能,结果代偿性扩张、肥厚,最终形成巨结肠,又称无神经节细胞症。诊断通常结合临床主要症状、结肠的影像学表现、直肠测压以及直肠活检的组织学特征,HD 典型的组织学特征包括神经节细胞缺失和粗大的神经干^[5],通过对人胚胎发育研究发现,这是由于神经节细胞的前体(神经管嵴细胞)向后肠迁移缺陷所致^[6]。通过 HD 和神经管嵴干细胞联合研究发现^[7],某些因子可影响神经管嵴干细胞的分化、发育和神经嵴细胞的迁移。

目前已在 HD 发现多种基因突变,最常见和重要的是 RET 原癌基因突变, GDNF 是 RET 的配基之一^[8],是一类结构上属于转化生长因子- β (TGF- β 超家族的新亚族)。在 HD,单纯 GDNF 突变很少见,发现的 RET 原癌基因突变又不能解释所有的 HD,故 GDNF 成为理想的候选基因。一旦 GDNF 缺失或减少,RET 介导的传导通路几乎中断。以往的研究结论指出, GDNF 的突变不足以引起 HD 发病,但近年研究发现^[9], GDNF 与多种神经元的生存支持和分化

有关,不但对中枢神经系统的神经元具有营养和保护作用,而且对胃肠道神经元、周围自主神经及感觉神经元等多种神经元均有明显的神经营养及神经保护作用。

肠神经系统的发育需要多种蛋白因子协调作用来调控神经管嵴细胞的迁移、增殖和分化, GDNF 为神经元和肠道神经节细胞有力的营养和生存因子,作为 RET 传导通路的重要成员,若 GDNF 减少或缺失,中断了 RET 基因和 GDNF 间维持结肠神经节细胞的信号,使神经节细胞的祖细胞(神经管嵴干细胞)在之后的分化、迁移过程发生障碍,产生巨结肠。而且,在 HD 神经细胞的移植治疗中, GDNF 也发挥着重要作用^[10]。

ICC 主要分布在消化道肠神经系统自主神经末梢与平滑肌细胞间, ICC 间, ICC 与平滑肌细胞间可见 GJ^[7], ICC 是由肠神经系统到平滑肌的传导中介。有研究发现^[11~13], ICC 在 HD 正常神经节细胞肠段减少预示着术后不良的临床结果,可能与肠蠕动不良有关,因此需要强制对 HD 术后标本行 c-Kit 阳性细胞分布检查,以便对每个病例选择最合适的手术后疗法。

在本研究所收集 HD 不同肠段的手术标本中,发现

ICC 在 HD 不同肠段的分布不同,狭窄段在数量和形态上均与扩张段有差异,在狭窄段,肠神经节细胞缺如,ICC 的连续网络结构破坏,偶见残存的 ICC,突起变短、变钝。在 HD,肠神经节细胞和 ICC 在狭窄段同时缺如,说明两者可能存在内在联系,从胚胎发育角度分析,人类肠管 ICC 出现在胚胎早期,并且在出生后 ICC 仍继续发育成熟。ICC 不是来自于神经嵴,与 ENS 同源^[14],但 ENS 与 ICC 的分化成熟互相影响,在胚胎期肠神经元能够产生 c-Kit 的配体:干细胞因子(stem cell factor, SCF)和 SCF/c-Kit 的信号传导对于维持 ICC 前体向 ICC 分化和表型起关键作用^[15],在无此配体条件下 ICC 前体细胞将只能发育成平滑肌细胞表型。在肠神经元减少或缺失的条件下,SCF 减少,从而 ICC 的分化成熟受阻^[16]。其损害可能是 HD、慢传输型便秘(STC)、慢性假性肠梗阻(CIP)和先天性肥厚性幽门狭窄(CHPS)等肠运动功能障碍疾病的病因之一^[17],也是神经节细胞减少或缺失的直接后果。本研究还发现,在 HD 狭窄段,有 2 例标本 ICC 分布及数量基本正常,形态呈梭形或星形,大小与扩张段无明显差异,大多 ICC 见 2~3 个突起,但仍未改善肠道的运动功能障碍,患儿仍有严重的便秘、腹胀及不全性肠梗阻,由此可见,若无肠神经节细胞存在,即便是有 ICC 分布,也无法发挥作用,从此种意义解释,ICC 异常分布可能并不是 HD 发病的最根本病因,其数量、形态异常可能是受神经影响的结果;或虽有接近正常分布的 ICC,但其功能可能受损,导致严重的肠运动功能障碍。本研究 ICC 在 HD 扩张段与狭窄段肠管分布与形态的差异,说明 ICC 与 HD 发病有关。

GJ 是细胞间信息传导的主要通道,Cx43 在动物体内分布很广,包括心肌细胞、平滑肌细胞、内皮细胞和结缔组织细胞等。其中 Cx43 是一种主要的 GJ 蛋白,Cx43 蛋白与机体多种疾病的病理生理过程有密切联系,其表达异常与多种疾病的发生有关^[18]。Cx43 在机体多种器官组织平滑肌表达的高低与其功能密切相关。Seki 等^[19]发现,Cx43 在 HD 大鼠扩张段结肠壁表达丰富,移行段减少,狭窄段缺失。由此推测,各种先天性或后天性因素引起 GJ 结构破坏,导致细胞间信息和物质传递障碍,可能是 HD 肠动力障碍的多种致病因素之一。另外,Banneman 等^[20]发现,在肠神经发育过程中,细胞间重要的相互作用是通过 GJ 介导,早期移行的神经管嵴细胞装配有功能性的 GJ,应用免疫组化和特异性抗体证实,在鼠移行的神经管嵴细胞有 Cx43 和 Cx46 表达,结果提示 GJ 对神经管嵴细胞的存活是必须的。

本研究从转录水平研究 GDNF mRNA 在 HD 不同肠段的表达,通过半定量 RT-PCR 法检测不同肠段、不同临床类型 GDNF mRNA 表达。与扩张段亚组和对照组相比,狭窄段 GDNF mRNA 的表达明显减低,1 例短段型未能扩增出目标带,提示 GDNF 减少与肠神经节细胞的缺失有关,可能参与了 HD 的发病机制。与狭窄段常见型相比,短段型

GDNF mRNA 表达明显降低,提示 GDNF 在 HD 不同类型发病中作用不同。GDNF 减少可能与短段型关系更密切。通过免疫组化研究发现,在对照组及 HD 扩张段亚组肠壁的环肌层和纵肌层,尤其是环肌层的最外层,有阳性至强阳性的 Cx43 表达,在狭窄段肠壁内表达明显减少或消失。在 HD 有神经节细胞肠段肠壁的蠕动功能是正常的,在无神经节细胞肠段肠蠕动功能减弱或消失。由此推测,HD 肠壁内缝隙连接结构缺失或结构破坏,可能妨碍细胞间信号物质的传递,从而引起肠蠕动功能异常;或缝隙连接的减少影响神经管嵴细胞的生存和发育,从而导致 HD,此点与 GDNF 似有相同之处。

总之,HD 发病的机制目前尚未完全阐明,本研究发现无论是 GDNF 基因表达异常,抑或是 Cx43 表达分布异常,均可能对神经管嵴细胞产生某种特定的影响,导致神经管嵴细胞的迁移、分化及维持、存活发生障碍,从而引起 HD;神经节细胞的缺失,可能引起 ICC 分布及形态改变,ICC 和肠道平滑肌细胞间联系减少,其连接结构 Cx43 亦减少,导致 HD 患儿产生严重的肠运动功能障碍,为研究 HD 的发病机制奠定了实验和理论基础。

本研究的不足之处:①技术方法的不完善,未能使用免疫组化双标或多标技术,使不同肠段的神经节细胞、ICC 及 Cx43 共同显色,以使结果更严谨和直观。②仅对与 HD 有关的众多基因中的一个进行了研究,其他基因是否同时存在异常未能说明,下一步通过设计其他实验补充验证。

参考文献

- [1] de Lorijn F, Boeckxstaens GE, Benninga MA. Symptomatology, pathophysiology, diagnostic work-up, and treatment of Hirschsprung disease in infancy and childhood. *Curr Gastroenterol Rep*, 2007, 9(3):245-253
- [2] Qiao YC (乔颜春), Sun Q. 连接蛋白 Connexin43 的研究进展. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine* (国际病理科学与临床杂志), 2005, 25(4):345-347
- [3] Cottrell GT, Burt JM. Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1711(2):126-141
- [4] Yin MZ (殷敏智), Zhang ZD, Shen P. Application of Immunohistochemistry Study on Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *J Appl Clin Pediatr* (实用儿科临床杂志), 2005, 20(11):1159-1160
- [5] Barshack I, Fridman E, Goldberg I, et al. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Clin Pathol*, 2004, 57(7):712-716
- [6] Martucciello G, Brizzolara A, Favre A, et al. Neural crest neuroblasts can colonise aganglionic and ganglionic gut in vivo. *Eur J Pediatr Surg*, 2007, 17(1):34-40

- [7] Uesaka T, Jain S, Yonemura S, et al. Conditional ablation of GFR α in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. *Development*, 2007, 134(11):2171-2181
- [8] Maroldt H, Kaplinovsky T, Cunningham AM. Immunohistochemical expression of two members of the GDNF family of growth factors and their receptors in the olfactory system. *J Neurocytol*, 2005, 34(3-5):241-255
- [9] Nagy N, Goldstein AM. Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(1):43-55
- [10] Almond S, Lindley RM, Kenny SE, et al. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut*, 2007, 56(4):489-496
- [11] Wu XH(吴小红), Wang BX, Wang MG. Development of interstitial cells of Cajal in fetal intestines. *Journal of The Fourth Military Medical University(第四军医大学学报)*, 2005, 26(21):1971-1974
- [12] Taguchi T, Suita S, Masumoto K, et al. Universal distribution of c-kit-positive cells in different types of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*, 2003, 19(4):273-279
- [13] Taguchi T, Suita S, Masumoto K, et al. An abnormal distribution of C-kit positive cells in the normoganglionic segment can predict a poor clinical outcome in patients with Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg*, 2005, 15(3):153-158
- [14] Lorincz A, Redelman D, Horváth VJ, et al. Progenitors of interstitial cells of cajal in the postnatal murine stomach. *Gastroenterology*, 2008, 134(4):1083-1893
- [15] Al-Muhsen SZ, Shablovsky G, Olivenstein R, et al. The expression of stem cell factor and c-kit receptor in human asthmatic airways. *Clin Exp Allergy*, 2004, 34(6):911-916
- [16] Horváth VJ, Vittal H, Lőrincz A, et al. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology*, 2006, 130(3):759-770
- [17] Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, et al. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology*, 2007, 50(2):176-189
- [18] Kostin S. Zonula occludens-1 and connexin 43 expression in the failing human heart. *J Cell Mol Med*, 2007, 11(4):892-895
- [19] Seki K, Komuro T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell Tissue Res*, 2001, 306(3):417-422
- [20] Bannerman P, Nichols W, Puhalla S, et al. Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *J Neurosci Res*, 2000, 61(6):605-615

(收稿日期: 2008-07-25 修回日期: 2008-08-17)

(本文编辑: 张崇凡)

广州市儿童医院举办全国小儿免疫性疾病学习班通知

随着我国社会经济发展及环境的变化,小儿免疫性疾病的发病有明显的上升趋势,2008年12月13~18日在广州市五羊城酒店举办全国小儿免疫性疾病学习班。将邀请重庆医科大学附属儿童医院杨锡强教授、北京儿童医院何晓琥教授等知名专家授课,内容包括:儿科免疫缺陷病、过敏性变态反应性疾病、自身免疫性疾病及感染与免疫4个方面。主要内容有:原发性免疫缺陷病的诊断及治疗;儿童免疫功能的评价;过敏性鼻炎、哮喘的诊断及脱敏治疗、儿童免疫相关性胃肠病、儿童皮肤过敏性疾病、儿童药物及食物过敏;过敏性紫癜、川崎病、幼年特发性关节炎及巨噬细胞活化综合征、系统性红斑狼疮等疾病的诊断及治疗;儿童常见病毒感染、反复呼吸道感染及全身性感染的免疫机制及治疗;免疫吸附、血液净化、干细胞移植等实用先进技术在儿科免疫性疾病的临床应用;过敏原测定及自身免疫性疾病的实验室检查等。学习班将紧密结合临床,兼顾科研,还将邀请资深编辑就儿科医学论文书写进行讲座,学习班授I类学分9分。

有意参加学习班的医生请与广州市儿童医院免疫科孙广超医生联系,通信地址:广州市人民中路318号(510120),E-mail:sungch001@21cn.com,手机:13512792272。

《现代小儿胸心外科学》出版

由张善通、陈张根和贾兵主编的《现代小儿胸心外科学》于2007年3月由上海科学技术文献出版社出版发行。

本书以复旦大学附属儿科医院30年来累积的经验和手术病例为基础,并邀请我国内地和香港地区专家参加编写,系统地介绍儿童胸心外科疾病的最新诊治方法和技术,包括麻醉、体外循环和围术期处理、手术适应证、手术方法、介入治疗、内外科镶嵌治疗和术后并发症等的处理,以及微创外伤、内镜外科和组织工程等。编写中还参考国外近年来公开发表的著作,反映了学科的最新发展趋势。本书内容丰富全面,图文并茂,可供儿童胸心外科、成人胸心外科、心内科、麻醉科、体外循环、心超诊断、心内和心外科监护室医生、技师、护士以及研究生、本科生阅读。本书共57章,约100万字。定价200元。