

# 先天性巨结肠 Pax3 和 Cx43 基因突变及表达

高红, 张志波, 王维林, 黄英

高红, 中国医科大学盛经医院卫生部小儿先天畸形重点实验室  
辽宁省沈阳市 110004  
张志波, 王维林, 黄英, 中国医科大学盛经医院小儿外科  
辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人: 高红, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛经医院卫生部小儿先天畸形重点实验室. gaohong515@sina.com  
电话: 024-83956257  
收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-07-15

## 摘要

**目的:** 探讨 Pax3(pairedbox3)和 Cx43(connexin43)基因在先天性巨结肠(Hirschsprungs disease, HD)中突变及表达的意义, 分析 HD 与 Pax3 和 Cx43 基因异常的关系。

**方法:** 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和银染单链构象多态性(SSCP)方法检测 Pax3 和 Cx43 基因突变和 mRNA 表达情况。

**结果:** 正常人38例肠段对照组织中DNA未发现Cx43 SSCP异常泳动带, 而仅有3例(7.9%)出现 Pax3 PCR 产物单链异常泳动带; HD38例肠管组织中17例(44.7%)出现 Pax3 PCR 产物单链异常泳动带, 11例(28.9%)出现 Cx43 PCR 产物单链异常泳动带. HD 各段肠管组织中均有 Pax3 基因 mRNA 的表达, 痉挛段、移行段和扩张段肠管组织中 Pax3 mRNA 高表达, 表达率分别为 92.1%, 86.8% 和 76.3% ( $\text{mean} \pm \text{SD} = 1.63 \pm 0.37; 1.42 \pm 0.41 \text{ 和 } 1.25 \pm 0.17$ ); 而正常肠段组织中 Pax3 mRNA 无表达, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ). Cx43 基因 mRNA 在痉挛段、移行段肠管组织中低表达, 表达率为 23.7% 和 18.4% ( $\text{mean} \pm \text{SD} = 0.62 \pm 0.11 \text{ 和 } 0.51 \pm 0.07$ ); 而扩张段肠管组织中 Cx43 有较高表达, 表达率为 55.3% ( $\text{mean} \pm \text{SD} = 1.37 \pm 0.19$ ). 38名正常人肠段对照组织中无1例 Cx43 mRNA 阳性表达。

**结论:** HD 组织中 Pax3 和 Cx43 基因突变及表达异常可能与 HD 的发生相关密切, Pax3 和 Cx43 突变可能造成信息传递缺陷, 扰乱了神经嵴细胞的迁移, 从而导致 HD 的发生。

高红, 张志波, 王维林, 黄英. 先天性巨结肠 Pax3 和 Cx43 基因突变及表达. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2254-2256  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2254.asp>

## 0 引言

先天性巨结肠(Hirschsprungs disease, HD)是家族性遗传病, 是新生儿期低位肠梗阻最常见的原因之一, 发病率约 1/5 000. 在胚胎发育过程中, 由原始干细胞分化、增生形成各种特定组织细胞过程是各种细胞因子共同作用、精确调控的结果. Pax3 (pairedbox3)是胚胎发育

中生肌前体细胞移行、增生、分化及神经胚层发育的重要调控因子, 是转录因子基因家族的成员之一, 具有高度的结构<sup>[1]</sup>. 间接连接蛋白Cx43(connexin43)是一种主要的细胞间隙连接蛋白, 是一抑癌基因<sup>[2]</sup>, Cx 基因的表达状态与胚胎发育、细胞诱导、分化、生长控制、细胞程序性死亡及衰老死亡等生物过程有着十分密切的关系. 我们从基因突变和mRNA表达2个层次对HD Pax3 和 Cx43 基因异常进行研究如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HD38例组织取自1999-2003年手术切除离体后30 min 内获得标本. 男27例, 女11例. 按照病理形态学改变留取痉挛段、移行段和扩张段标本; 38名正常对照取自正常人肠段组织, 迅速保存于-76℃冰箱中. 用Trizol Total RNA(美国GIBCO)提取标本总RNA, 经20 g/L 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计, 测定  $A_{260}/A_{280}$ , 确定 RNA 浓度和纯度, 纯度在 1.75-2.0.

**1.2 方法** 在 20  $\mu\text{L}$  逆转录体系中, 含有总 RNA 1  $\mu\text{g}$ , 0.5 mmol/L dNTPs, 2.2  $\mu\text{mol/L}$  oligo(dT)15, 3 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1.5 MU/L RNasin, 15 MU/L M-MLVRT 的溶液, 补充 DD  $\text{H}_2\text{O}$  至总体积 20  $\mu\text{L}$ , 经 65℃ 1 min, 30-65℃ 30 min, 60℃ 30 min, 98℃ 5 min, 5℃ 5 min 合成 cDNA. 引物设计应用电脑软件 Primer 5.0 版, Pax3-F 5' -CAA CCA CAT CCG CCA CAA-3', Pax3-R 5' -GCT TAC CTC GCT CGC TCA-3', 片段长度 437 bp; Cx43-F 5' -TTC AAG GGC GTT AAG GAT-3', Cx43-R 5' -CCA GGA GGA GAC ATA GGC-3', 片段长度 158 bp;  $\beta$ -actin-F 5' -GAT TGC CTC AGG ACA TTT CTG-3',  $\beta$ -actin-R 5' -GAT TGC TCA GGA CAT TTC TG-3', 片段长度 690 bp. 以各标本样品为 cDNA 模板,  $\beta$ -actin 基因为内参照, 对 Pax3 和 Cx43 基因 mRNA 进行定量分析: 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 加入 cDNA 产物 3  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 8 mmol/L dNTPs, 15  $\mu\text{mol/L}$  的 Pax3 和 Cx43 和  $\beta$ -actin 引物, Taq DNA 聚合酶 3 U, Pax3, Cx43,  $\beta$ -actin PCR 条件: 94℃ 3 min (94℃ 40 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min)35 循环, 72℃ 7 min. 所得产物 10  $\mu\text{L}$  经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 5 g/L 溴乙锭荧光染色 10 min 后, 凝胶成像扫描系统扫描拍照. 经 1D KODAK 图像分析仪扫描出底片中 Pax3, Cx43 和  $\beta$ -actin 基因 RT-PCR 扩增带的信号强度(图 1, 2), 样品的 Pax3 mRNA 相对表达强度: Pax3/ $\beta$ -actin 强度之比; 样品的 Cx43 mRNA 相对表达强度: Cx43/ $\beta$ -actin 强度之比. 在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 加入 cDNA 产物 3  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR

表1 HD病变肠管Pax3和Cx43 mRNA表达(mean±SD)

肠管段	阳性例数		吸光度 A 值		阳性率(%)	
	Pax3	Cx43	Pax3	Cx43	Pax3	Cx43
正常人肠管段	0	0	0.23±0.09	0.30±0.17	0	0
痉挛段	35	9	1.63±0.37	0.62±0.11	92.1	23.7
移行段	33	7	1.42±0.41	0.51±0.07	86.8	18.4
扩张段	29	21	1.25±0.17	1.37±0.19	76.3	55.3

缓冲液 2.5 μL, 8 mmol/L dNTPs, Taq DNA 聚合酶 2 U, 15 μmol/L 的 Pax3 和 Cx43, PCR 条件与上述 RT-PCR 扩增一致. PCR 产物进行 SSCP 银染分析: 取 PCR 产物 10 μL, 加入甲酰胺变性液 10 μL, 96°C 变性 10 min, 冰中冷却立即上样, 80 g/L PAG, 300V 电泳 4 h, 凝胶经银染后拍照(图 3, 4).

**统计学处理** 数据以均数±标准差(mean±SD)表示, 组间差异比较采用统计分析软件 Excel 进行配对 *t* 检验,  $^aP<0.05$  为差异有统计学意义.

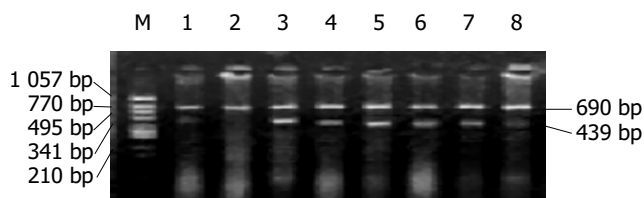


图1 HD Pax3 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳. M: fx174-Hinc II; 1, 2: 正常肠管段; 3, 4: 痉挛段; 5, 6: 移行段; 7, 8: 扩张段.

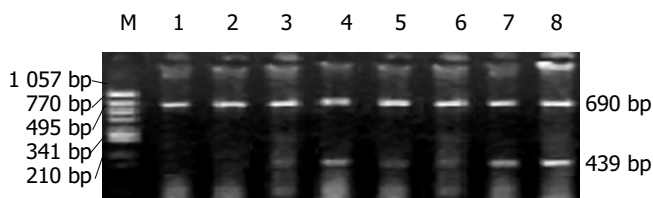


图2 HD Cx43 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳. M: fx174-Hinc II; 1, 2: 正常肠管段; 3, 4: 痉挛段; 5, 6: 移行段; 7, 8: 扩张段.

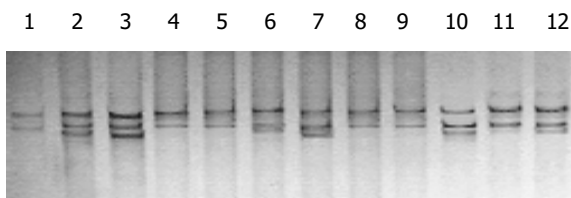


图3 HD Pax3 基因银染 SSCP 分析. 1, 5, 9: 正常肠管段; 2, 6, 10: 痉挛段; 3, 7, 11: 移行段; 4, 8, 12: 扩张段; (2, 3, 6, 7, 10, 12 见异常单链泳动带).

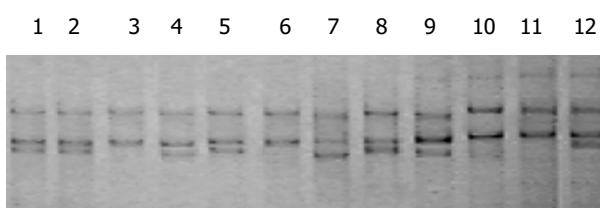


图4 HD Cx43 基因银染 SSCP 分析. 1, 5, 9: 正常肠管段; 2, 6, 10: 痉挛段; 3, 7, 11: 移行段; 4, 8, 12: 扩张段, (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 12 见异常单链泳动带).

## 2 结果

**2.1 HD 组织中 Pax3 和 Cx43 mRNA 表达** 以  $\beta$ -actin 作内参照, 发现痉挛段、移行段和扩张段肠管组织中 Pax3 mRNA 高表达(图 1, 表 1); 以  $\beta$ -actin 作内参照, 发现 Cx43 在痉挛段、移行段肠管组织中低表达; 而在扩张段肠管组织中 Cx43 较高表达(图 2, 表 1). 38 例正常对照肠段组织中无 1 例 Pax3 和 Cx43 mRNA 阳性表达, 具有显著性差异( $^aP<0.05$ ).

**2.2 HD 样品中 Pax3 和 Cx43 SSCP 分析** HD 38 例肠管组织中出现 Pax3 SSCP 单链异常泳动带(图 3)44.7%; Cx43 SSCP 单链异常泳动带(图 4)28.9%; 正常 38 例肠段对照组织中 DNA 未发现 Cx43 SSCP 异常泳动带, 而仅有 3 例(7.9%)出现 Pax3 PCR 产物单链异常泳动带.

## 3 讨论

Pax3 是一类重要的转录调控因子, 在胚胎发育过程中对组织和器官的特异化起着重要的调控作用. Pax3 突变, 可直接影响中枢神经系统及神经嵴细胞衍生组织的发育<sup>[3]</sup>, 造成胚胎发育异常<sup>[4]</sup>. Cx43 是与神经管的发育形成密切相关的结构基因<sup>[5]</sup>, 在 7.5 d 的小鼠胚胎中即开始表达, Cx43 基因过表达或 Cx43 基因敲除鼠子代胚胎神经管缺陷畸形发生率明显升高<sup>[6-7]</sup>. Pax3 等基因的表达具有时间上的二相性, 即在未分化的细胞中高表达, 在细胞分化过程中表达下降, 而在终端分化的细胞中表达上调<sup>[8]</sup>.

HD 是一种最常见的先天畸形, 是遗传因素和环境因素综合作用的结果. 目前主要认为是神经嵴细胞源性疾病和多基因遗传病. 本研究发现 Pax3 与 HD 的发生有着密切的关系, 本研究显示 Pax3 基因 mRNA 在痉挛段、移行段和扩张段阳性检出率分别为 92.1%、86.8% 和 76.3%; 明显高于正常段肠管组织( $^aP<0.05$ ). 这种表达的差异在来自同一患者的肠管组织标本及正常肠管对照组织的配对资料中更为显著. 这提示, Pax3 基因可能影响其胚胎发育, 神经节细胞发育不全, 而导致 HD 的原因之一. 本结果还证实, 在 HD 肠管组织中存在比较高的 Pax3 基因突变, 突变型标本中的 SSCP 条带除异常泳动带外, 具有与同一对照标本相同的泳动带, 提示在 HD 中 Pax3 基因的突变是杂合性的. 而正常对照出现的极少 Pax3 SSCP 异常泳动带可能是由于其他原因引起, 需进一步测序证实.

目前认为, 连接蛋白(Connexin, Cx)基因家族是一抑

癌基因家族。Cx43 是一种主要的细胞间隙连接蛋白,其表达异常与多种疾病的发生有关。近来研究表明,多种癌细胞中都有 Cx43 表达下降, Cx43 基因表现出肿瘤抑制基因的特点<sup>[1]</sup>。在神经系统和循环系统尚未建立或未发育完善的早期胚胎,长距离信息传递难以进行,胚胎各部分细胞的增生,分化与生长发育离不开细胞间化学信息的交换。Maass *et al*<sup>[9]</sup>发现Cx43无义突变可造成信息传递缺陷,影响神经细胞的迁移、增生及细胞凋亡过程。Bronner-Fraser *et al*观察了神经嵴细胞迁移过程中的细胞直接接触,发现细胞间黏附改变扰乱了神经嵴细胞的迁移,从而导致神经管缺陷(neural tube defects, NTDs)<sup>[8]</sup>的发生。Huang *et al*<sup>[10]</sup>报道,转染的Cx43cDNA的人胶质瘤细胞Cx43mRNA表达水平升高,生长速度减慢,转染Cx43基因的细胞增生活性明显下降,凋亡现象并未增加,提示Cx43基因主要通过抑制细胞增生,而不是通过诱导凋亡调控细胞生长。本结果与之相似,Cx43在扩张段肠管中高表达(55.3%),而在痉挛段和移行段肠管中低表达(23.7%, 18.4%)。由于Pax3是调控基因,Cx43是结构基因,我们认为Cx43可能是Pax3的负表达调控基因,HD可抑制Cx43的表达,使其对Cx43基因的转录抑制增高,使Cx43低表达,造成缝隙连接紊乱,进而发生HD。Cx43在HD肠管组织中出现SSCP异常泳动带,同时也提示Cx43基因的突变是杂合性的。关于HD的发生机制及预防措施是目前研究的热点,Pax3和Cx43在消化道神经丛内的发育过程中十分重要,Pax3和Cx43表达水平的改变则可引起HD,其机制可能有:细胞凋亡、氧自由基的参与及引起调控基因表达的改变。Pax3和Cx43基因突变与HD的分子生物学基础研究还需扩大样本数量以及完善随

访资料有待深入研究。

#### 4 参考文献

- 1 Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 2002;18:41-47
- 2 Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, D'Herde K. Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1199-1207
- 3 Milewski RC, Chi NC, Li J, Brown C, Lu MM, Epstein JA. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* 2004;131:829-837
- 4 Roberts C, Sutherland HF, Farmer H, Kimber W, Halford S, Carey A, Brickman JM, Wynshaw-Boris A, Scambler PJ. Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2002;22:2318-2328
- 5 Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MV, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2556-2561
- 6 Teunissen BE, Jansen AT, van Amersfoort SC, O'Brien TX, Jongma HJ, Bierhuizen MF. Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 2003;322:123-136
- 7 Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Regulation of hematopoiesis by gap junction-mediated intercellular communication. *J Leukoc Biol* 2001;70:341-347
- 8 Wiggan O, Fadel MP, Hamel PA. Pax3 induces cell aggregation and regulates phenotypic mesenchymal-epithelial interconversion. *J Cell Sci* 2002;115:517-529
- 9 Maass K, Ghanem A, Kim JS, Saathoff M, Urschel S, Kirfel G, Grummer R, Kretz M, Lewalter T, Tiemann K, Winterhager E, Herzog V, Willecke K. Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. *Mol Biol Cell* 2004; 8 [Epub ahead of print]
- 10 Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin43 (Cx43). *Cancer Res* 1998;58:5089-5096

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## SARS 患者肝脾心肺组织中病毒的分离和鉴定

朱雷, 胡燕, 沈宏辉, 戚扬, 赵景民, 辛绍杰, 赵敏, 程云, 赵根田, 貌盼勇

朱雷, 胡燕, 沈宏辉, 戚扬, 赵景民, 辛绍杰, 赵敏, 程云, 赵根田, 貌盼勇, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所病毒研究室 北京市 100039  
项目负责人: 貌盼勇, 100039, 北京西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所病毒研究室. maopy302@yahoo.com.cn  
电话: 010-66933315 传真: 010-63831874  
收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-07-27

### 摘要

**目的:** 从 SARS 患者尸检肝、脾、心、肺组织中分离病毒并鉴定及评定中和抗体与 SARS 病程的关系。

**方法:** 取各组织 100 g/L 匀浆后的上清, 接种非洲绿猴肾单层细胞, 观察细胞病变; 采用 RT-PCR 及序列分析等技

术鉴定病毒并研究其生物学特性; 将收集的 SARS 患者早期和恢复期血清做中和实验。

**结果:** 分别从 SARS 患者尸检肝、脾、心、肺等组织中分离到致细胞病变的病毒, 用各组织的病变细胞提取的 RNA 为模板分别扩增出部分 S 区和 N 区的 DNA 片段, 经 DNA 序列分析表明所有 S 区和 N 区的核苷酸序列均与 GenBank 上的 SARS 冠状病毒该区域的序列完全一致, 中和实验显示所做 10 份 SARS 患者双份血清均有中和抗体效价的 4 倍升高, 轻症患者中和抗体产生时间明显早于重症患者。