

文章编号:1671-7554(2014)09-0015-05

DOI:10.6040/j.issn.1671-7554.0.2014.018

先天性巨结肠症中 Neuroigin2 基因的表达及意义

杨洪超,王健,张文同,李爱武

(山东大学齐鲁医院小儿外科, 山东 济南 250012)

摘要:目的 研究先天性巨结肠症(HD)患儿各段肠管中 Neuroigin2 基因的表达情况,探讨 Neuroigin2 表达与 HD 发生的可能关系。方法 选取山东大学齐鲁医院小儿外科行手术治疗的 HD 患儿结肠标本共 42 例,将 HD 患儿正常段设为正常对照组,移行段及狭窄段设为实验组,应用 Western blotting、实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)及免疫组织化学染色方法观察 Neuroigin2 在各肠段的表达情况。结果 Western blotting 结果显示 Neuroigin2 蛋白在狭窄段相对表达量为 0.012 ± 0.001 ,明显少于移行段和正常段(0.039 ± 0.001 , 0.057 ± 0.002 ; $P < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示,Neuroigin2 的 mRNA 水平与蛋白表达趋势一致。免疫组织化学染色示 HD 患儿正常段肠管的肌间肠神经节细胞中有 Neuroigin2 强阳性细胞的表达,而在狭窄段肠管中弱阳性表达,移行段肠管可见 Neuroigin2 阳性细胞的表达。结论 HD 患儿狭窄段肠管中 Neuroigin2 的表达缺失可能与 HD 的发生有关。

关键词:先天性巨结肠症;Neuroigin2;实时荧光定量聚合酶链式反应

中图分类号:R726 文献标志码:A

Expression and significance of Neuroigin2 in children with hirschsprung's disease

YANG Hongchao, WANG Jian, ZHANG Wentong, LI Aiwu

(Department of Pediatric Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Neuroigin2 in normal and spastic segments of colon in children with hirschsprung's disease (HD), and to explore the correlation of Neuroigin2 with pathogenesis of HD. **Methods** A total of 42 resected colon specimens of HD cases treated during 2012 to 2013 were enrolled. Normal colonic segments were served as control group, while the transitional and spastic segments as experimental group. Neuroigin2 expression was detected with immunohistochemical staining, Western blotting, and qRT-PCR. **Results** Western blotting revealed that Neuroigin2 protein in spastic segments (0.012 ± 0.001) was lower than that in transitional segments and normal segments (0.039 ± 0.001 and 0.057 ± 0.002 , respectively; $P < 0.05$). qRT-PCR revealed that Neuroigin2 mRNA level was consistent with the protein expression. A large number of Neuroigin2 positive gangliocytes were observed in the control group, while none was observed in spastic segments. Significantly fewer Neuroigin2 positive gangliocytes were found in the transitional segments. **Conclusion** Neuroigin2 is significantly down-regulated in spastic colon segments, which may be associated with the pathogenesis of HD.

Key words: Hirschsprung's disease; Neuroigin2 gene; Quantitative real-time polymerase chain reactions

先天性巨结肠(hirschsprung's disease, HD)又名“肠管无神经节细胞症”,是由遗传和环境多因素

共同作用所致肠神经系统(enteric nervous system, ENS)早期发生多基因突变的神经嵴细胞源性疾

收稿日期:2014-01-09;网络出版时间:2014-07-02 21:08

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/doi/10.6040/j.issn.16717554.0.2014.018.html>

基金项目:国家自然科学基金(81270720);山东大学自由探索科研基金(2012ZD026)

通讯作者:李爱武。E-mail:liaiwu2012@126.com

病^[1]。虽然关于 HD 发病机制的基础性研究不少,但多是孤立地从单方面进行研究,比如研究最多的 RET 基因以及多数其他基因(SOX10 基因、ECE1 基因等)的突变只是大约在 50% 的家族性病例患儿中出现,以及 7% 到 35% 的散发病例中出现,并不能解释所有患儿的发病机制^[2]。

Neuroigin2 为突触后跨膜蛋白,它的存在对中枢神经系统(central nervous system, CNS)突触的形成、发育以及突触功能循环具有重要的作用^[3]。已发现,ENS 与 CNS 是有关联的^[4-5],Neuroigin2 在 HD 各肠段组是否表达并存在表达的异常尚不清楚。对此,我们应用免疫组织化学、Western blotting 及 qRT-PCR 观察 Neuroigin2 在各肠段的表达情况,探讨此基因对 HD 发病的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 收集 2012-2013 年在山东大学齐鲁医院小儿外科行手术治疗的 HD 患儿 42 例,男 36 例,女 6 例,其临床表现及影像学检查均符合 HD,并且经术后病理切片证实。手术均采用经肛门

Soave 巨结肠根治术,其中 8 例长段型巨结肠患儿采用腹腔镜辅助下巨结肠根治术。根据术中结肠形态区分为正常对照组、移行段组、狭窄段组,取各结肠管全层组织,无菌剪取,部分放入无菌 EP 管中,液氮中速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存,部分放入 4% 甲醛溶液中固定。

1.1.2 主要仪器及试剂 电泳仪(BioRad Power/Pac3000)、转印电泳槽(BIDRAD)、实时定量 PCR 仪(瑞士 Roche Molecular Biochemi—cals LightCycler Operator 7S Manual Version 3.5 October 2000)、RNA 反转录仪(德国 Eppendorf)、显微镜(Nikon E800);总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus(日本 TaKaRa),反转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser(日本 TaKaRa)、SYBR® Premix Ex Taq™ II Tli RNaseH Plus(日本 TaKaRa)、鼠抗人 β -actin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)、羊抗人 Neuroigin2 蛋白抗体(美国 Santa Cruz)、 β -actin 及 Neuroigin2 引物(上海生工生物工程股份有限公司,具体见表 1)、浓缩型 DAB 试剂盒、山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

表 1 引物序列、退火温度及扩增片段长度

基因	双向引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	片段长度(bp)
Neuroigin2	F:CCAGTCTCCCGTCTACTTTTACA	59	316
	R:CTGCTTCTCCTTGCTGTTGAAT		
β -actin	F:AGCGAGCATCCCCAAAGTT	60	285
	R:GGGCACGAAGGCTCATCATT		

F:上游引物;R:下游引物。

1.2 方法

1.2.1 Western blotting ①总蛋白提取:取 3 组全层肠组织各 25 mg 放入 EP 管中,加入 300 μ L RIPA 细胞裂解液(RIPA:PMSF = 100:1)经匀浆器充分匀浆破碎、低温离心(4 °C, 12 000 $\times g$) 20 min,取上清液,取部分上清液测蛋白浓度,余加入适量 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 \times),沸水浴 10 min 充分变性,-20 °C 保存;②电泳:取总蛋白 30 μ g,经 5% 浓缩胶 SDS-PAGE 电泳 80 V, 30 min, 8% 分离胶 100 V 电泳 45 min;③转印:按照海绵—滤纸—0.45 PVDF 膜—凝胶—滤纸—海绵的顺序转印,250 mA 90 min;5% BSA 封闭 1 h;④免疫检测:PVDF 膜浸于一抗溶液[羊抗人 Neuroigin2 抗体(1:200 稀释);鼠抗人 β -actin 抗体(1:2 000 稀释)],4 °C 过夜;次日室温孵育 30 min, TBST 洗膜 4 次, 5 min/次;室温下 PVDF 膜分别浸于二抗溶液[辣根酶标

记的兔抗山羊 IgG(1:5 000 稀释)及羊抗鼠 IgG(1:5 000 稀释)] 中 1 h;洗膜 4 次, 5 min/次;加 Immobilon Western 化学发光 HRP 底物,照相;⑤用 Gel-Pro analyzer 4.0 分析结果,以相对灰度值代表蛋白表达量;相对灰度值 = Neuroigin2 IOD/ β -actin IOD。

1.2.2 qRT-PCR ①总 RNA 提取与测定浓度:取 3 组肠段全层组织各 25 mg,充分剪碎。参照 RNAiso Plus Total RNA 提取试剂(TaKaRa)说明书提取总 RNA,并检测总 RNA 浓度(紫外分光光度法),于 -80 °C 保存备用;②cDNA 合成:应用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 将总 RNA 转录为 cDNA, 20 μ L 反转录体系,包括 5 \times g DNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, Total RNA 1 μ g, RNase Free dH₂O 补足 10 μ L, 42 °C 2 min, hold 4 °C;然后加入 5 \times PrimeScript® Buffer 2 (for Real Time) 4 μ L, PrimeScript. RT Enzyme Mix I

1 μL , RT Primer Mix 1 μL , RNase Free dH_2O 补足 20 μL , 反应条件: 37 $^\circ\text{C}$ 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 5 s, hold 4 $^\circ\text{C}$; ③qRT-PCR 反应: 据 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 荧光定量 PCR 试剂盒, 在 20 μL 反应体系中, 加入 SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μL , PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , cDNA 2 μL , dH_2O 补足至 20 μL , 应用 Light-Cycler[®] System Real Time PCR 扩增仪荧光定量 PCR 仪进行反应; ④qRT-PCR 分析: 分别测定每个样品 Neurologin2 mRNA 的 Ct 值, 每个样品均作复管以减少操作误差。采用相对定量方式表示各样品 SIPI 的 ΔCt , $\Delta\text{Ct} = \text{Ct 目的基因} - \text{Ct 内参基因}$ 。再依据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-\Delta\text{Ct 目的基因} - \Delta\text{Ct 参照因子}}$, 计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。当目的基因与内参基因的扩增效率接近时, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示所检测样品相对于作为参照因子样品的目的基因的表达倍数。

1.2.3 免疫组织化学 ①石蜡: 切片置 65 $^\circ\text{C}$ 烤箱 45 min, 快速到二甲苯 I、II、无水乙醇、95%、85%、75% 顺序泡缸, 蒸馏水冲洗 min; ②抗原修复: 切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0), 微波炉加热, 高火 7 min, 冷却 2 min; 然后 80% 最高火力 1.5 min, 冷却 1 min, 循环 8 次, 自然冷却 PBS 洗 3 次, 5 min/次; ③灭活内源性过氧化物酶: 3% H_2O_2 , 37 $^\circ\text{C}$, 15 min, PBS (pH 7.3) 洗 3 次, 5 min/次; ④封闭: 5% BSA 溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 30 min, PBS 洗 3 次, 5 min/次; ⑤稀释 Neurologin2 一抗 (1:50), 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; ⑥次

日 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBST (pH 7.3) 洗 3 次, 5 min/次; 滴加 Polymer Helper, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, PBST 洗 3 次, 5 min/次; 滴加 poly-HRP anti-Goat IgG, SAB, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, PBST 洗 3 次, 5 min/次; ⑦DAB 显色: 配制 DAB 显色工作液, 混匀后加至切片, 室温显色, 镜下控制反应时间 (3~5 min), 至显色要求后蒸馏水洗涤; ⑧苏木素复染, 1% 盐乙醇浸泡分化, 自来水冲洗返蓝, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察。切片照相 (Nikon E800) 与分析; ⑨结果判断标准: SIP/ 的免疫反应按免疫着色密度划分为 3 个等级: (- ~ +) 无免疫着色 (阴性, 无色); (+ ~ ++) 偶见免疫着色 (弱阳性, 呈淡黄色); (++) ~ (+++) 免疫着色丰富 (强阳性, 呈棕黄色)。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism[®] 5 统计软件, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用方差分析及 Tukey 法进行统计处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blotting Neurologin2 在 HD 正常对照组蛋白相对含量为 0.057 ± 0.002 , 移行段组蛋白相对含量为 0.039 ± 0.001 , 狭窄段组中蛋白相对表达量为 0.012 ± 0.001 ; 正常对照组与移行段组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Neurologin2 在狭窄组中表达较正常对照组、移行段组均少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

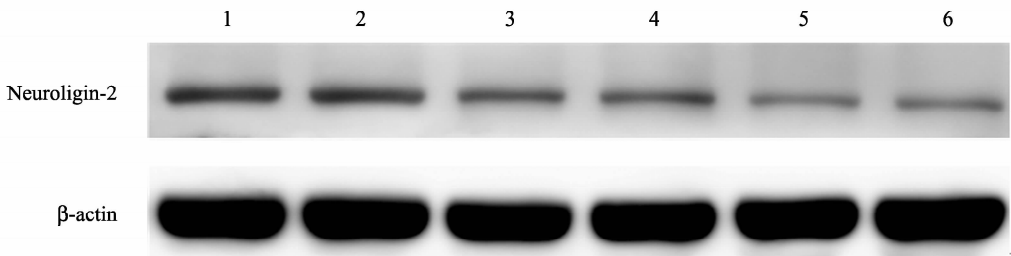


图 1 Neurologin2 蛋白在 HD 中表达结果
1、2 为正常对照组; 3、4 为移行段组; 5、6 为狭窄段组。

Fig. 1 Neurologin2 expression in children with HD by Western blotting

1, 2: Normal ganglionic colon segments; 3, 4: Transitional colon segments; 5, 6: Aganglionic colon segments.

2.2 qRT-PCR 正常对照组与移行段组中均有 Neurologin2 mRNA 的表达, 并且正常对照组的表达较移行段组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Neurologin2 mRNA 在狭窄段肠管中无明显表达, 其与正常对照组和移行段组中的表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 比较 3 肠段组 Neurologin2 mRNA 表达

组别	例数	Neurologin2
正常对照组	42	$(9.46 \pm 0.21) \times 10^{-5}$
移行段组	42	$(4.74 \pm 0.23) \times 10^{-5}$
狭窄段组	42	$(1.20 \pm 0.11) \times 10^{-5}$
<i>P</i>		< 0.05

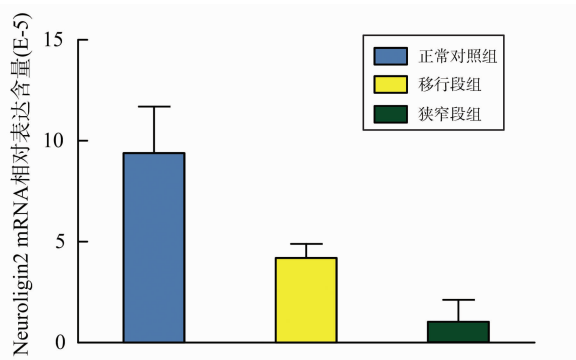


图2 3肠段组 Neurologin2 mRNA 表达比较

Fig.2 qRT-PCR results of Neurologin2 expressions in different colonic segments

2.3 免疫组织化学 Neurologin2 在正常对照组肠管(图3A、a)纵行肌和横行肌之间的大而椭圆、细胞核偏向一侧的成熟神经节细胞中呈强阳性表达(++~+++),其胞浆呈深染棕黄色;在移行段组(图3B、b)的纵行肌和横行肌之间的梭形或不规则形神经节细胞中呈弱阳性表达(+~++),其胞浆呈浅棕黄色;在狭窄段组(图3C、c)纵行肌和横行肌间无神经节细胞,呈阴性表达(-~+),见极少棕黄色颗粒。见图3。

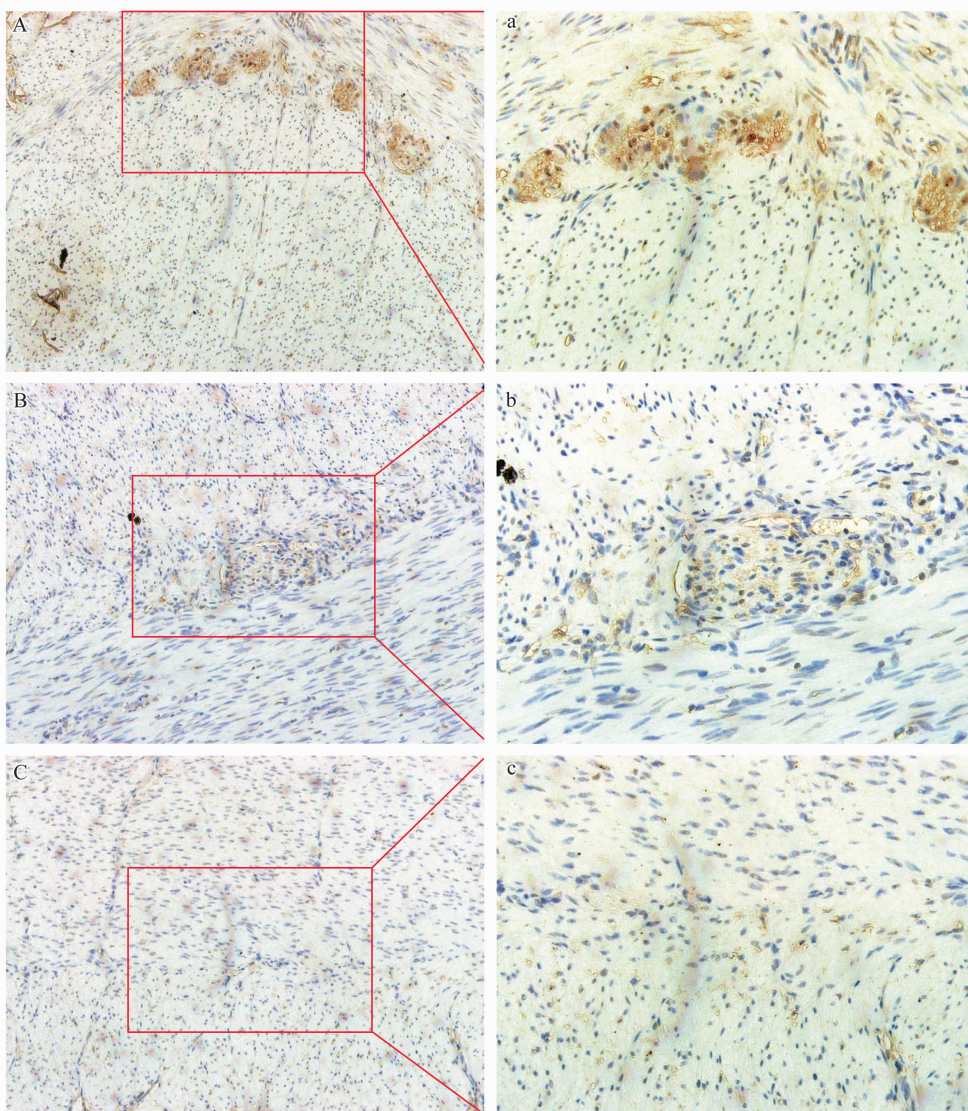


图3 Neurologin2 蛋白在 HD 不同肠段神经节中的表达

A & a: 正常对照组肠管肌间强阳性染色(++~+++)(A, ×200; a, ×400); B & b: 移行段组肠管肌间神经节呈阳性染色(+~++)(B, ×200; b, ×400); C & c: 狭窄段组肠管肌间呈弱阳性染色(-~+)(C, ×200; c, ×400)。

Fig.3 Expression of neurologin2 in HD by immunohistochemistry assay

A & a: Intensive expression in muscular plexuses of normal control group (++~+++)(A, ×200; a, ×400); B & b: Positive expression in muscular plexuses of transitional colon segments (+~++)(B, ×200; b, ×400); C & c: Weakly positive expression in aganglionic colon segments (-~+)(C, ×200; c, ×400).

3 讨 论

先天性巨结肠患儿末端肠管神经节细胞缺如,是较早发现并研究的肠神经发育缺陷病^[6]。肠神经节细胞缺如的发生,与许多早期基因突变有关,包括 RET、GDNF、NRTN、EDN3、ECE1、PAX3、SOX10 等,这些基因影响多潜能神经前体的发育,而且多数病例是多基因相互作用的结果^[1,7],可这些基因只能解释部分患儿的病因。

在中枢神经系统中,突触前膜与突触后膜间的正常联系对神经可塑性机制的调节起到关键性作用,比如学习过程、记忆机制及精神障碍性疾病的发生发展等^[8]。Neurexin 基因表达于突触前膜,Neuroigin 基因表达于突触后膜,在突触中形成 Neuroigin/Neurexin 蛋白复合体,且被证实,Neuroigin 与 Neurexin 相互作用介导突触的连接,并诱导突触的分化与构成^[9]。Neuroigin2 是 Neuroigin 超家族中的一个亚型,主要在 CNS 神经元的抑制性突触后膜表达^[10-11]。Neuroigin2 与 Neurexin 相互作用可以促进 CNS 中 GABA 能神经突触的形成、发育及分化,并参与突触功能的循环^[12]。研究表明,ENS 和 CNS 之间有密切的联系,某些基因及蛋白在 ENS 和 CNS 中具有同样重要的作用^[13]。目前关于 Neuroigin2 在 CNS 中的研究已经很完善^[14],但是在 ENS 的作用目前仍不清楚。Neuroigin2 基因缺失或者突变都可能影响 ENS 中突触的形成及突触信息的传递,从而影响了 HD 狭窄段以及移行段的蠕动功能。

本实验收集 HD 各段结肠组织为标本,为了使所测得目的基因表达含量更准确,我们采用 Western blotting、qRT-PCR 两种可互相论证的试验技术对目的基因在 3 组肠段进行检测,实验结果证实 HD 肌间神经丛目的基因的表达在不同肠段之间存在着明显差异。本实验又采用免疫组织化学染色方法观察 Neuroigin2 在各肠段部位的表达情况,发现在正常对照组肠管肌间有大而椭圆、细胞核偏向一侧的成熟神经节细胞中呈强阳性表达;在移行段的肌间的有不规则形神经节细胞中呈弱阳性表达,而在狭窄段无神经节细胞,呈阴性表达,见极少棕黄色颗粒。因此,我们得出 Neuroigin2 基因在人类 ENS 有表达,而且可能与 ENS 突触的形成、发育有一定关系;Neuroigin2 基因的缺失或者突变可能影响了 ENS 中突触的形成及突触的信息传递,从而影响了 HD 病变肠段的蠕动功能。但是对于 HD 疾病发生的具体参与机制,还需我们进一步研究;对于 Neuroigin2

在 HD 各段中表达的研究也进一步论证 HD 的形成是多基因作用的结果,为 HD 的研究提供了新的思路和研究方向。

参考文献:

- [1] Bergeron K F, Silversides D W, Pilon N. The developmental genetics of Hirschsprung's disease[J]. Clin Genet, 2013, 83(1): 15-22.
- [2] Yamamoto T, Ono K, Hitomi S, et al. Endothelin receptor-mediated responses in trigeminal ganglion neurons[J]. J Dent Res, 2013, 92(4): 335-339.
- [3] Fritschy J M, Panzanelli P, Tyagarajan S K. Molecular and functional heterogeneity of GABAergic synapses[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(15): 2485-2499.
- [4] Comletti D, De Jaco A, Jennings L L. The Arg451 Cys-neuroigin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing [J]. J Neurosci, 2004, 24(43): 4889-4893.
- [5] Hampton T. Scientists scan genome for autism clues[J]. JAMA, 2007, 297(12): 1303-1304.
- [6] Holschneider A M, Meier-Ruge W, Ure B M. Hirschsprung's disease and allied disorders- a review[J]. Eur J Pediatr Surg, 1994, 4(5): 260-266.
- [7] Dang R, Torigoe D, Sasaki N, et al. QTL Analysis identifies a modifier locus of aganglionosis in the rat model of hirschsprung disease carrying Ednrb (sl) mutations [J]. PLOS ONE, 2011, 6(11): e27902 doi: 10.1371/journal.pone.0027902.
- [8] Sudhof T C. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease[J]. Nature, 2008, 455(7215): 903-911.
- [9] Chih B, Afridi S K, Clark L, et al. Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins [J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(14): 1471-1477.
- [10] Pouloupoulos A, Aramuni G, Meyer G, et al. Neuroigin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin[J]. Neuron, 2009, 63(5): 628-642.
- [11] Chi B, Engelman H, Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins[J]. Science, 2005, 307(5713): 1471-1477.
- [12] Graf E R, Kang Y, Hauner A M, et al. Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1b LNS domain[J]. Neuro Sci, 2006, 26(16): 4256-4265.
- [13] Moore S W. Hirschsprung's disease and the brain[J]. Pediatr Surg In, 2011, 27(4): 347-352.
- [14] Krueger D D, Tuffy L P, Papadopoulos T, et al. The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses [J]. Curr Opin Neurobiol, 2012, 22(3): 412-422.