

# SOX10 mRNA 在先天性巨结肠肠壁中的表达

黄 华<sup>1</sup> 陈 琦<sup>2</sup> 曹振杰<sup>2</sup> 侯广军<sup>1</sup> 张二划<sup>1</sup> 黄 敏<sup>1</sup> 杨启政<sup>2</sup>

**【摘要】 目的** 研究性别决定区 Y 基因相关高可变区基因 10 (SRY related high mobility group-BoX gene 10, SOX10) 在先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)肠壁中的表达情况,以进一步了解 HD 在分子基础上的发病机制。**方法** 分别取 12 例先天性巨结肠病例的手术标本狭窄段、移行段及扩张段,随机取 12 例非巨结肠手术病例(如结肠造瘘或关瘘手术)作为对照组,提取平滑肌组织总 RNA,应用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)扩增目的基因和看家基因片段,观察病变段和正常段 SOX10mRNA 的表达,并与看家基因( $\beta$ -actin)在病变段和正常段的表达比较,进行统计学分析。**结果** SOX10mRNA 在 HD 患儿痉挛段呈低表达,在扩张段及正常对照组呈高表达。痉挛段 SOX10mRNA 的表达量与移行段、扩张段及正常对照组比较,差异均有统计学意义;而移行段、扩张段及对照组比较,差异无统计学意义。**结论** HD 患儿结肠 SOX10mRNA 的异常分布显示 SOX10 基因是出生后肠神经系统维持正常功能所必需的,SOX10mRNA 表达减少可引起肠管痉挛,肠腔狭窄,造成肠功能障碍。

**【关键词】** Hirschsprung 病 / 外科学;RNA, 信使

**The expression of SOX10 mRNA in the Hirschsprung's disease Patient's bowel.** HUANG Hua<sup>1</sup>, CHEN Qi<sup>2</sup>, CAO Chen-jie<sup>2</sup>, et al. 1, Department of pediatric surgery, Zhengzhou children's hospital; 2, Department of Pediatric surgery, the third affiliated hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450053, china.

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of SOX10 mRNA in the sporadic Hirschsprung's disease (HD) patient's bowel to understand the molecular basis for the pathogenesis of HD. **Methods** Smooth muscle tissues from diseased and normal segments of 12 patients with HD were isolated respectively and preserved in -80°C refrigerator. RNA of each segment was isolated, then the DNA of SOX10 and a house keeper gene ( $\beta$ -actin) were amplified by using reverse transcription poly-merase chain reaction (RT-PCR) technique. The data of results were analyzed with the SPSS10.0 statistical software. **Results** Use paired-samples t test, the expression of SOX10 mRNA in spastic segment was lower that of in transitional segment ( $p < 0.05$ ) and normal segment ( $p < 0.05$ ) in HD patients. While the expressions were not significantly different between transition segment and normal segment ( $P > 0.05$ ) in HD patients. **Conclusions** The differ SOX10mRNA expression in differ segments in non-syndromic HD patients and normal infants concluded that SOX10 is normally required postnatally in the functional maintenance of the entire enteric nervous system, if the absence of ganglion cells expression reduced, it may be aroused the intestine spastic and stricture and made its function obstacle.

**【Keywords】** Hirschsprung Disease/SU;RNA, Messenger.

先天性巨结肠症(Hirschsprung's disease, HD)是小儿外科临床一种很常见的消化道发育畸形,是一种先天性疾病。目前研究已表明,HD 是由于多基因和环境因素共同作用的结果。近年来,SOX10 基因参与神经元的发育越来越受到人们的关注。SOX10 基因编码为 SRY(性别决定 Y 基因)相关高可变区转录因子,位于染色体 22q13,其首先在鼠体克隆成功。SOX10 基因编码产物为一个 SRY 相关转录因子家族的成员,在 ENS

始祖细胞迁移至消化管间质组织之前表达。以前关于 SOX10 表达模式的研究主要是在胚胎时期<sup>[1]</sup>,近年来有关出生后组织中 SOX10 的细胞分布及表达已有报道<sup>[2]</sup>。国内相关研究较少。本文运用 RT-PCR 技术检测 SOX10mRNA 在散发性 HD 肠壁中的表达,进一步了解 HD 在分子基础上的发病机制,为临床提供参考。

## 材料与方法

### 一、临床资料

实验组:2003 年 7 月至 2004 年 7 月共 12 例 HD

作者单位:1,郑州市儿童医院外一科(河南省,450053);2,郑州大学第三附属医院儿外科(河南省,450053),E-mail: huanghua0989@yahoo.com.cn

患儿,男 8 例,女 4 例。年龄 9 至 14 岁,其中新生儿 3 例;1 个月至 3 岁 8 例;14 岁 1 例。长段型 1 例,常见型 4 例,短段型 7 例。均为散发性,无家族史,无合并其他主要脏器的先天性畸形或综合征。术中取狭窄段、移行段、扩张段肠管新鲜标本。病理解剖分型参照临床常用分型方法<sup>[9]</sup>。

对照组:随机选取 12 例非巨结肠手术患儿,年龄 2 d 至 2 岁,男女比例为 1:1。其中肛门直肠畸形 4 例(肛门闭锁 1 例、直肠闭锁 3 例),均行结肠造瘘术,肠套叠行肠吻合术 6 例,关瘘术 2 例。取造瘘口处肠壁,并经病检存在神经节细胞。

标本均取全层肠壁组织,用无菌生理盐水冲洗,置 DEPC 水处理过的 Ep 管中,送 -80℃ 恒温冰箱中保存。待做 RT-PCR 分析。实验组均经术前临床诊断,X 线钡剂检查即术中所见诊断为 HD,术后常规组织学检查证实为 HD。

二、RT-PCR 方法

1. 试剂:SK1311 Trizol RNA 抽提试剂盒;random primers;dNTP mix;Rnasin;琼脂糖;DNA Marker DL2000bp。

2. 引物:据文献<sup>[7]</sup>SOX10 (250bp)、β-actin (330bp)引物序列。SOX10:上游 5'-ATACGACACT GTGCCGGCCCTAAA-3',下游 5'-TTCTCCTCTGTCC AGCCTGTTCTC-3',β-actin:上游 5'-CAAGGCCA ACCGCGAGAAGATG-3',下游 5'-CAGCACGATGC AGCGGGACCTG-3'。

3. 总 RNA 的提取:所有标本用 Trizol 提取总 RNA,紫外分光光度计测吸光度 OD260/OD280 值,计算 RNA 纯度。

4. 逆转录合成:cDNA 反应体系为 25 ul,其中总 RNA 10.5 ul,dNTP 1 ul,random primer 1 ul,ddH<sub>2</sub>O 12.5 ul,5×buffer 4 ul,DTT 2 ul,M-Mulv 反转录酶 1 ul。具体步骤参照逆转录试剂盒推荐方法。

5. PCR 扩增:反应总体积为 50 ul。cDNA 1 ul,ddH<sub>2</sub>O 22 ul,premix Taq 25 ul,上下游引物各 1 ul。PCR 反应条件 SOX10 预变性 94℃ 5 min 1 次,94℃ 1 min,69℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环,延伸 72℃ 10 min;β-actin 预变性 94℃ 5 min 1 次,94℃ 1 min,57℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环,延伸 72℃ 10 min。

6. 产物分析:于 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后紫外线下观察 PCR 扩增产物,MarkerDL2000 为分子量标准。用凝胶图象分析仪观察电泳结果,并应用分析软件作半定量分析,计算 SOX10mRNA 与 β-actin 的光密度比值。

三、统计学处理

用统计软件 SPSS10.0 进行统计学处理,采用方差分析,组间两两比较应用 q 检验,以  $\alpha < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

一、鉴定纯度

将提取的总 RNA 经紫外分光光度计测定,OD260 / OD280 在 1.8 ~ 2.0 之间,视为抽提的总 RNA,纯度良好。

二、RT-PCR 定性及半定量分析

SOX10mRNA 在 HD 患儿痉挛段表达减少,而在移行段、扩张段、对照组的表达无明显变化,见图 1。

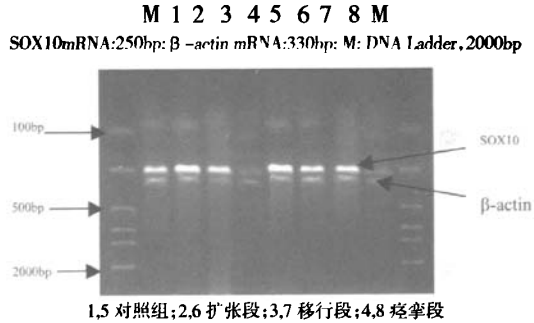


图 1 SOX10mRNA 和 β-actin mRNA 在痉挛段、移行段、扩张段和对照组结肠肠壁中的表达

痉挛段分别与移行段、扩张段、对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );移行段、扩张段、对照组之间相互比较,差别无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 SOX10mRNA 在痉挛段、移行段、扩张段、对照组结肠肠壁中的表达

分组	例数	SOX10mR-	P 值
痉挛	12	1.0881 ± 0.1356	
移行	12	1.3189 ± 0.0569	0.000*□
扩张	12	1.3439 ± 0.0446	0.000*□0.236▲
对照	12	1.3416 ± 0.0605	0.000*□0.318▲0.913◆
组间比较		F = 27.052	P = 0.000

讨 论

随着分子生物学技术的发展,越来越多的研究提示 HD 是一种多基因控制的疾病,一些基因的缺失或突变可导致微环境改变,引起肠神经母细胞(神经嵴胚细胞)迁移的停顿而导致 HD。文献报道先天性巨结肠的病因可能与原癌基因 RET、血内皮素 B

受体基因 (EDNRB) 及其配基血管内皮素-3 基因 (EDN3) 有关<sup>[9]</sup>。

近年来, SOX 基因与 HD 的关系逐渐受到人们关注。1990 年, Sinclair 等<sup>[10]</sup>学者分离出性别决定基因 -SRY (sex determining Region Y gene), 其在胚胎发育过程中决定着睾丸的形成。SRY 基因的发现导致了一个新的基因家族 -SOX 基因家族的发现。目前所知与 HD 关系最密切的是 SRY 相关高可变区基因 10 (SRY related high mobility group-Box gene 10, SOX10)。SOX10 位于染色体 22q13.1<sup>[11]</sup>。SOX10 编码一个转录因子, 其在胚胎期的神经嵴细胞内有表达, 这一现象出现在不同的神经嵴源细胞(如肠神经元)从外胚层分离出来之前, 此后, SOX10 在细胞迁移过程中被转录。

现已证明, 在鼠晶胚发育中, SOX10 在迁移的神经嵴和外周神经系统的派生物中表达。现已利用原位杂交技术证实, 在人的早期胚胎中, 其表达模式和鼠早期胚胎的表达模式完全一样<sup>[11]</sup>。Pingault 等<sup>[16]</sup>报道 4 位并发肠神经节发育异常的家族性瓦尔敦堡综合征(waardenburg-shah syndrome, WS)患者存在 SOX10 基因的突变, 这些突变造成 SOX10 产物表达异常。其中 3 例合并 HD。这 3 例患者的 SOX10 突变分别为无意义、插入、缺失突变。而 2 例 HD 合并 WS 的患者存在 SOX10 突变, 1 例为短段型 HD, 1 例为全肠型 HD, 2 例均存在严重的其他先天性畸形。由此得出 SOX10 基因与 HD 发生密切相关。然而, 关于 SOX10 在胎儿出生后肠神经系统的特殊表达以前的研究报道较少<sup>[14,7]</sup>。


作者通过对 SOX10mRNA 在非 HD 患儿和非症候群 HD 患儿结肠中的表达研究发现, SOX10mRNA 在正常对照组的每个样本都有表达, 表明 SOX10 在胚胎发育之后的成熟 ENS 有一定的作用。Okamoto<sup>[11]</sup>用放射性免疫组织化学检测结果发现, SOX10 清晰的表达在正常肠管的肌间丛、粘膜下丛和纵肌环肌间的神经纤维周围; 不同病理节段肠管的表达模式与一氧化氮合成酶(NOS)和神经生长因子受体(GNFR)完全一样<sup>[11]</sup>, 并证明 SOX10 在神经元只有神经胶质细胞需要 SOX10 的作用<sup>[9]</sup>。本研究 SOX10mRNA 在所有肠管中均有表达, 可证实 SOX10 基因与整个肠神经系统的正常发育和功能有关, 而 SOX10mRNA 在非症候群的 HD 患儿结肠扩张段、移行段、痉挛段逐渐减少, 且扩张段和正常(非 HD 患儿)结肠平滑肌组织中的表达无显著性差异, 这种异常分布可能与肠神经系统的发育异常有关。

HD 的病理特征是尾端肠管黏膜下层和肌层缺乏神经节细胞, 由过度增生的神经纤维所取代。这些非正常的神经束由胆碱能神经纤维组成, 是来自骶尾区的外周副交感神经纤维, 具有抗神经生长因子受体抗体的免疫反应性。现已清楚 HD 主要是因为起源于内在神经系统的迷走神经嵴不正常发育, 导致迁移至末端肠管的神经节细胞缺乏。通常源于骶嵴的神经细胞也能在末端肠管的内在神经节起作用, 至于神经嵴的神经细胞为什么不能弥补 HD 中缺乏的神经节细胞尚不清楚。本研究发现, SOX10mRNA 在 HD 患儿无神经节细胞肠管中的表达显著减少, 可能是由于远端结肠内能正常表达 SOX10mRNA 的固有神经节细胞缺乏, 表明 SOX10 可能是维持正常肠神经系统功能的必要基因, 如 SOX10mRNA 表达减少, 则引起肠管痉挛、肠腔狭窄, 造成功能障碍, 但是否引起肠神经节细胞缺乏等尚有待进一步研究。SOX10mRNA 在末端肠管均有表达, 可能是因为存在有能被 SOX10 处理的神经营养因子或乙酰胆碱脂酶受体的交互作用, 刺激无神经节肠管中类胆碱能和其他兴奋性神经纤维生长。

## 参 考 文 献

- 1 Okamoto E, Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease[J]. J Pediatr Surg, 1967, 2:327.
- 2 Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, et al. SOX10 mutations in Patients with Waardenburg-Hirschsprung disease [J]. Nat Genet, 1998, 18:171-173.
- 3 李正, 王慧贞, 吉士俊. 实用小儿外科学[M], 第 1 版, 人民卫生出版社, 2001, 797-799.
- 4 Sinclair AH, Betra P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex determining region encodes a Protein with homology to a conserved DNA-binding motif (J) [J]. Nature, 1990, 346: 240-244.
- 5 Shimotake T, Tomiyama H, Aoi S, et al. Discrepancy between macroscopic and microscopic transitional zones in Hirschsprung's disease with reference to the type of RET/GDNF/SOX10 gene mutation [J]. J Pediatr Surg, 2003, 38 (5): 698-701.
- 6 Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, et al. SOX10 mutations patients with waardenburg-Hirschsprung disease [J]. Nature Gen, 1998, 18:171-173.
- 7 M H Sham, V C H Lui, M Fu, et al. SOX10 is abnormally expressed aganglionic bowel of Hirschsprung's disease infants [J]. Gut, 2001, 49: 220-226.

# SOX10 mRNA在先天性巨结肠肠壁中的表达

作者：[黄华](#)，[陈琦](#)，[曹振杰](#)，[侯广军](#)，[张二划](#)，[黄敏](#)，[杨启政](#)  
作者单位：[黄华, 侯广军, 张二划, 黄敏 \(郑州市儿童医院外一科, 河南省, 450053\)](#)，[陈琦, 曹振杰, 杨启政 \(郑州大学第三附属医院儿外科, 河南省, 450053\)](#)  
刊名：[临床小儿外科杂志](#)   
英文刊名：[JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY](#)  
年，卷(期)：2008，7(3)  
被引用次数：0次

## 参考文献(7条)

- 1.Sinclair AH;Betra P;Palmer MS [Agene from the human sex determing region encodes a Protein with homology to a consered DNA-binding motif\(J\)](#) 1990
2. [李正;王慧贞;吉士俊 实用小儿外科学](#) 2001
- 3.[Pingault V;Bondurand N;Kuhlbrodt K](#) [SOX10 mutations in Patients with Waardenburg-HirschsPrung disease](#) 1998(2)
- 4.[Okamoto E;Ueda T](#) [Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease](#) 1967
5. [M H Sham;V C H Lui;M Fu](#) [SOX10 is abnormally expressed aganglionicbowelofHirschsprung'sdiseaseinfants](#) 2001
- 6.[Pingault V;Bondurand N;Kuhlbrodt K](#) [SOX10 mutations patients with waardenburg-Hirsehsprung disease](#) 1998(2)
- 7.[Shimotake T;Tomiyaama H;Aoi S](#) [Discrenancy between macroscopic and microscopic transitional zones in Hirschsprung's disease with reference to the type of RET/GDNF/SOX10 gene mutation](#) 2003(05)

本文链接：[http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_lcxewkzz200803011.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200803011.aspx)

授权使用：黔南民族师范学院(gnnzsfxy)，授权号：fcb9dd0c-74ae-48ad-b2cb-9ed40103f9fb

下载时间：2011年4月29日