

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.19.003  
文章编号: 1005-8982 (2021) 19-0014-05

儿科疾病专题·论著

## 先天性巨结肠患儿不同肠管中SOX-2、SOX-10、GDNF的表达及其临床意义\*

庞文帅, 马建苏, 刘晓丽, 周丽霞, 王博, 王淼

(邢台市人民医院, 河北 邢台 054031)

**摘要:** **目的** 探讨先天性巨结肠患儿不同肠管中SOX-2、SOX-10、GDNF的表达及意义。**方法** 选取2014年1月—2019年8月邢台市人民医院手术治疗的先天性巨结肠患儿85例作为观察组, 取切除的狭窄段、扩张段和移行段肠管组织, 将同期行结肠造瘘术的患儿20例作为对照组, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肠管组织SOX-2、SOX-10、GDNF的表达。**结果** 各组肌间神经丛直径、神经节细胞直径、神经节细胞数、神经节细胞质/核比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中, 肠肌间神经丛直径: HD组狭窄段 < HD组移行段 < HD组扩张段和对照组; 神经节细胞直径、神经节细胞数、神经节细胞质/核: HD组移行段 < HD组扩张段和对照组; 各组SOX-2、SOX-10、GDNF mRNA的相对表达量比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), HD组狭窄段 < 病例组移行段 < HD组扩张段和对照组。对照组与HD组扩张段比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 先天性巨结肠患儿病变肠管组织中SOX-2、SOX-10、GDNF mRNA的相对表达量在扩张段、移行段、狭窄段逐渐降低, 这与病变肠神经系统发育异常有关。

**关键词:** 先天性巨结肠; SOX-2; SOX-10; GDNF

**中图分类号:** R726.5

**文献标识码:** A

## Expression and significance of SOX -2, SOX -10 and GDNF in different intestines of children with congenital megacolon\*

Wen-shuai Pang, Jian-su Ma, Xiao-li Liu, Li-xia Zhou, Bo Wang, Miao Wang

(Xingtai People's Hospital, Xingtai, Hebei 054031, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and significance of SOX-2, SOX-10 and GDNF in the different intestinal tracts of children with congenital megacolon disease (HD). **Methods** Selected 85 cases of HD children in our hospital from January 2014 to August 2019 who underwent surgical treatment as the observation group, of which the intestinal canal tissues of the narrowed, lated, and transitional segments were removed for experiment. At the same time, 20 cases of children undergoing colostomy were used as the control group. The fluorescent quantitative PCR was used to detect the mRNA levels of the SOX-2, the SOX-10, and the GDNF in the intestinal tissue. **Results** The diameter of myenteric nerve plexus, ganglion cell diameter, ganglion cell number, ganglion cytoplasm/nucleus ratio were compared in each group, and the difference was statistically significant after analysis of variance (all  $P < 0.05$ ). Among them, the diameter of the intestinal myenteric plexus: HD group stenosis segment < HD group transitional segment < HD group expansion segment and control group; ganglion cell diameter, ganglion cell number, ganglion cytoplasm/nucleus ratio: HD group transitional segment < HD The expansion segment of the group and the control group. Comparison of the relative expression of SOX-2, SOX-10, GDNF at the

收稿日期: 2021-04-06

\* 基金项目: 2018年度河北省医学科学研究重点课题计划(No: 20181201)

[通信作者] 王淼, E-mail: 2352577@qq.com; Tel: 15231915556

mRNA level of each group showed statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Among them, the relative expression of SOX-2, SOX-10, and GDNF at the mRNA level: stenosis segment in HD group  $<$  transition segment in case group  $<$  expanded segment in HD group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the control group and the HD group in the expansion segment ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion** The expression levels of SOX-2, SOX-10, and GDNF in the pathological bowel tissues of HD children were gradually reduced in the dilatation segment, transitional segment, and stenosis segment, which were related to abnormal development of the pathological bowel nervous system.

**Keywords:** hirschsprung disease; SOX-2; SOX-10; glial cell line-derived neurotrophic factor

先天性巨结肠,又称希尔斯施普龙病(hirschsprungs disease, HD)是新生儿常见的先天性发育停顿疾病,发病率约为1/5 000,男性发病率高于女性,为4:1<sup>[1]</sup>。病理变化主要是直肠、结肠神经节细胞缺如,表现为新生儿出生后胎粪排出延迟、腹胀、结肠炎、低位性肠梗阻等,不仅影响患儿的生长发育,严重时还会危及患儿生命<sup>[2]</sup>。近年来流行病学调查显示,HD的发病率呈上升趋势<sup>[3]</sup>,因此研究HD的病因及机制对优生优育十分重要。目前HD的病因和机制虽然尚未完全阐明,但随着分子生物学技术的发展,现有的研究已明确显示,HD的发生与SOX-2、SOX-10、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)密切相关<sup>[4-5]</sup>。本研究运用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测SOX-2、SOX-10、GDNF在HD患儿狭窄段、扩张段、移行段肠管组织及非HD患儿结肠中的表达情况,旨在阐明其在HD中的作用,进一步探讨HD在分子基础上的发病机制,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2014年1月—2019年8月邢台市人民医院手术治疗的HD患儿85例作为HD组,其中,男性71例,女性14例,年龄2个月~7岁,平均(3.7±0.6)岁。患儿术后均经病理组织学检查确诊为HD。其中,常见型62例,短段型23例;患儿均无HD家族史,均为散发性,均未合并其他器官先天性畸形。取HD患儿切除的狭窄段、扩张段、移行段组织作为HD各肠段组,同期选取行结肠造瘘术的患儿20例作为对照组,其中,男性16例,女性4例,年龄4个月~6岁,平均(3.9±0.7)岁,分别为先天性直肠肛管畸形16例,肛门直肠损伤4例。两组患儿年龄、性别比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 1.2 方法

**1.2.1 显微观察及测量** 取HE染色切片,观察对照组、HD组狭窄段、HD组扩张段、HD组移行段肌间神经节细胞数目,用显微测量软件测量肠肌间神经丛直径、神经节细胞直径、神经节细胞质/核,每张切片随机采集3个400倍视野,录入Excel表格,计算各组平均值。

**1.2.2 qRT-PCR** 取全层肠壁组织,弃去黏膜,用无菌生理盐水冲洗后置于Ep管中,于-80℃冰箱中保存。提取总RNA:检测时取肠组织200 mg,加入1 ml Trizol后置于冰水上的匀浆器中研磨,按说明书步骤提取总RNA。引物设计:采用Primer 5.0设计,SOX-2、SOX-10、GDNF引物序列见表1。

表1 SOX-2、SOX-10、GDNF引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
SOX-2	正向: 5'-TGGACAGTTACGGCCACAT-3'	22
	反向: 5'-CGAGTAGGACATGCTGTAGGT-3'	21
SOX-10	正向: 5'-AGTACCCGCACCTGCACAAC-3'	23
	反向: 5'-TGGTACTTGTAGTCCGGGTGCTC-3'	20
GDNF	正向: 5'-ATTGGCACCACACTTCTACA-3'	24
	反向: 5'-TCACGCACGATTTCCCTCTCAG-3'	26

**1.2.3 逆转录合成cDNA** 按Fermentas RT-PCR试剂盒说明书操作步骤操作,对提取的mRNA进行逆转录,反应体系为RNA模版2 μl, Oligo(dT)1 μl, 逆转录酶1 μl, 5× Buffer 5 PL, dNTP 2 μl, Ribalock抑制剂1 μl, RNase free H<sub>2</sub>O调整总体积至20 μl, GDNF反应条件为70℃预变性5 min, 37℃变性5 min, 42℃退火60 min, 70℃延伸10 min, 共32个循环。SOX-2、SOX-10反应条件为65℃预变性5 min, 42℃变性60 min, 70℃退火10 min, 共45个循环。PCR检测:引物通过GenBank查找SOX-2、SOX-10、GDNF的mRNA序列,计算机自动输出每

个cDNA模版标本的扩增曲线、CT值和拷贝数。

### 1.3 观察指标

比较对照组、HD组狭窄段、HD组扩张段和HD组移行段肌间神经节细胞数、肌间神经丛直径、神经节细胞直径、神经节细胞质/核；比较对照组、HD组狭窄段、HD组扩张段和HD组移行段SOX-2、SOX-10、GDNF mRNA的相对表达量。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 18.0统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,比较用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统

计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肠肌间神经丛直径等相关指标比较

各组肌间神经丛直径、神经节细胞直径、神经节细胞数、神经节细胞质/核比较,经方差分析,差异有统计学意义(均 $P<0.05$ )。其中,肠肌间神经丛直径:HD组狭窄段 $<$ HD组移行段 $<$ HD组扩张段和对照组;神经节细胞直径、神经节细胞数、神经节细胞质/核比:HD组移行段 $<$ HD组扩张段和对照组。见表2。

表2 对照组与HD组各肠段肌间神经丛直径、神经节细胞数、直径、质/核情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	肌间神经丛直径/ $\mu\text{m}$	神经节细胞数/个	神经节细胞直径/ $\mu\text{m}$	神经节细胞质/核
对照组	20	58.67 $\pm$ 11.72	5.72 $\pm$ 1.16	16.57 $\pm$ 3.61	2.33 $\pm$ 0.43
HD组扩张段	85	57.13 $\pm$ 10.86	5.62 $\pm$ 1.24	16.02 $\pm$ 3.52	2.20 $\pm$ 0.51
HD组移行段	85	34.28 $\pm$ 7.63 <sup>①②</sup>	1.86 $\pm$ 0.32 <sup>①②</sup>	11.82 $\pm$ 2.76 <sup>①②</sup>	1.60 $\pm$ 0.33 <sup>①②</sup>
HD组狭窄段	85	30.59 $\pm$ 6.24	-	-	-
<i>F</i> 值		11.073	24.637	19.286	29.763
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:HD组狭窄段神经节细胞缺如。①与对照组比较, $P<0.05$ ;②与HD组扩张段比较, $P<0.05$ 。

### 2.2 各组SOX-2、SOX-10、GDNF mRNA相对表达量比较

各组SOX-2、SOX-10、GDNF mRNA相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义( $P<$

0.05);进一步两两比较,HD组狭窄段 $<$ HD组移行段 $<$ HD组扩张段和对照组( $P<0.05$ )。对照组与HD组扩张段比较,差异无统计学意义( $P<0.05$ )。见表3。

表3 对照组与HD组各肠段SOX-2、SOX-10、GDNF mRNA的相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	SOX-2 mRNA	SOX-10 mRNA	GDNF mRNA
对照组	20	33.69 $\pm$ 7.85	1.34 $\pm$ 0.28	1.31 $\pm$ 0.21
HD组扩张段	85	32.84 $\pm$ 6.29	1.33 $\pm$ 0.36	1.19 $\pm$ 0.18
HD组移行段	85	31.13 $\pm$ 7.05 <sup>①②</sup>	1.30 $\pm$ 0.34 <sup>①②</sup>	0.89 $\pm$ 0.13 <sup>①②</sup>
HD组狭窄段	85	30.04 $\pm$ 5.42 <sup>①②③</sup>	1.08 $\pm$ 0.26 <sup>①②③</sup>	0.68 $\pm$ 0.11 <sup>①②③</sup>
<i>F</i> 值		9.672	8.054	11.072
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P<0.05$ ;②与HD组扩张段比较, $P<0.05$ ;③与HD组移行段比较, $P<0.05$ 。

## 3 讨论

HD是常见的先天性畸形之一,有研究显示,HD的病因与肠神经嵴细胞迁移形成肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的过程异常有关<sup>[6-8]</sup>。ENS由致密的神经纤维将特殊的胶质细胞和神经节细胞相互连接,组成一个独立完整的调节系统,对

肠道的血液循环、蠕动、吸收等进行调节<sup>[9]</sup>。本研究运用显微测量的方法测量对照组,HD组狭窄段、扩张段和移行段肌间神经节细胞数、肌间神经丛直径、神经节细胞直径、神经节细胞质/核,结果显示,肠肌间神经丛直径:HD组狭窄段 $<$ HD组移行段 $<$ HD组扩张段和对照组;神经节细胞直径、神经节细胞数、神经节细胞质/核:HD组移行

段< HD组扩张段和对照组。说明HD患儿部分肠段神经节细胞缺如,导致神经系统发育停顿,但原因迄今未明。

*Dom SOX-10*是杂合子动物中唯一被认识的产生致死性ENS表型的突变基因,其可改变正常读码框,导致一种截断的蛋白产物<sup>[10-11]</sup>。近年来动物实验研究证实,在显性巨结肠突变大鼠中*SOX-10*基因缺乏,导致ENS发育停顿,可能是神经嵴细胞突变后在移行早期过量死亡所致<sup>[12-14]</sup>。由此可见*SOX-10*基因可能参与肠神经元的发育。本研究结果显示,各组*SOX-10* mRNA相对表达量有差异。其中HD组狭窄段*SOX-10* mRNA相对表达量低于HD组移行段;HD组狭窄段和移行段均低于HD组扩张段和对照组。对照组、HD组扩张段*SOX-10* mRNA的相对表达量无差异。说明*SOX-10* mRNA在病变肠段中表达逐渐减少,特别是在无神经节细胞的狭窄肠段中表达减少得更加明显,分析原因由于狭窄肠管内缺乏正常表达*SOX-10* mRNA的肌间神经节细胞,可能在HD患儿肠管狭窄段中存在能被*SOX-10*处理的乙酰胆碱酯酶受体或神经营养因子,从而刺激无神经节细胞肠管中的其他兴奋性神经纤维生长,致神经纤维异常增生引起肠管狭窄痉挛和肠功能障碍<sup>[15-17]</sup>。同时也说明*SOX-10*可能是维持肠神经功能的重要基因。

*SOX-2*分子量约为35 kD,是多潜能性干细胞标志物,其转录激活区域为C末端,包含一段富含核苷酸的序列,*SOX-2*与*SOX-10*一样,均为*SOX*基因家族成员。近年来研究发现,不仅在生殖细胞、胚胎干细胞中表达,而且在正常肠道神经嵴细胞、胶质细胞衍生物中均广泛表达<sup>[18-20]</sup>,并参与广泛的发育调节。本研究结果显示,*SOX-2* mRNA相对表达量为狭窄段<移行段<扩张段。原因可能为*SOX-2*呈低表达时,不能很好地发挥发育调节作用,所以导致肠管狭窄。*GDNF*是转化生长因子(TGF)2B超家族的新亚族,是REX的配基之一<sup>[21-23]</sup>。既往研究认为*GDNF*的突变不足以引发HD,但近年来研究发现,REX基因突变是HD众多基因突变之一<sup>[18]</sup>。*GDNF*对胃肠道、中枢神经系统、周围自主神经、感觉神经等多种神经元均有营养和保护作用,与多种神经元的分化和生存支持有关<sup>[24]</sup>。胡晓丽等<sup>[25]</sup>应用免疫组织化学染色检测HD患儿狭窄

段、移行段和扩张段*GDNF*分布,结果显示狭窄段*GDNF*分布明显少于移行段和扩张段。本研究从转录水平研究HD患儿不同肠段*GDNF* mRNA的表达,结果显示,狭窄段<移行段<扩张段。与胡晓丽等结果基本相符,提示*SOX-2*、*GDNF*、*SOX-10*可能参与了ENS发育。

综上所述,HD的发生可能与多种基因一起导致病变肠段*SOX-2*、*SOX-10*等基因突变后,*SOX-2*、*SOX-10*、*GDNF*表达减少有关。本研究结果显示,HD患儿病变肠管组织*SOX-2*、*SOX-10*、*GDNF* mRNA相对表达量扩张段、移行段、狭窄段逐渐降低,说明*SOX-2*、*SOX-10*、*GDNF*可能是维持肠神经系统功能正常的必要基因,如果上述基因表达降低,则可能引起肠管狭窄出现功能障碍,但上述基因在HD发生中的作用尚有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 郑泽兵,高明娟,汤成艳,等.先天性巨结肠小肠结肠炎模型的建立及鉴定[J].中华小儿外科杂志,2019,40(7):644-649.
- [2] 张现伟,张飞,侯广军,等.先天性巨结肠儿童肠道菌群特异性变化[J].湖南师范大学自然科学学报,2019,42(4):53-58.
- [3] UESAKA T, JAIN S, YONEMURA S, et al. Conditional ablation of GFR $\alpha$  in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype[J]. Development, 2007, 134(11): 2171-2181.
- [4] 彭雪妮,沈淳.先天性巨结肠转录组学研究进展[J].中华小儿外科杂志,2019,40(6):567-573.
- [5] 王慧,姜茜.先天性巨结肠与RET基因的相关研究进展[J].医学研究杂志,2019,48(3):144-149.
- [6] 刘毅,刘远梅,黄露.母系表达基因3在小儿先天性巨结肠的表达及意义[J].中华小儿外科杂志,2019,40(1):69-73.
- [7] 赵凡,周崇高,许光,等.先天性巨结肠患儿结肠组织中配体盒基因6低表达的分子机制[J].中华新生儿科杂志,2020,35(3):223-226.
- [8] 胡露红,颀孙迪迪,陈绪勇,等.巨噬细胞活化在先天性巨结肠相关性小肠结肠炎发病机制中的作用[J].中华小儿外科杂志,2019,40(9):854-859.
- [9] 林宇,吴晓娟,黄文华,等.新生儿坏死性小肠结肠炎和先天性巨结肠肠穿孔的鉴别诊断和治疗[J].中华实用儿科临床杂志,2019,34(21):1645-1648.
- [10] 蒙信尧,焦春雷,颀孙迪迪,等.先天性巨结肠动物模型研究进展[J].中华小儿外科杂志,2019,40(7):656-660.
- [11] 陈钦明,吴凯,王健俊,等.先天性巨结肠组织中SOX-10、GDNF表达及意义[J].医学临床研究,2019,36(2):227-229.
- [12] 刘慧,雷蕾,徐曼,等.SOX2、SOX11在先天性巨结肠症中的表达及意义[J].中华小儿外科杂志,2018,39(9):682-687.

- [13] 刘慧, 徐曼, 雷蕾, 等. 先天性巨结肠中  $\beta$ -catenin, TCF/LEF 家族蛋白的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(10): 1080-1085.
- [14] 张亚飞, 余辉, 郑百俊, 等. miR-34a-5p 靶向 GMFB 抑制细胞增殖对先天性巨结肠的治疗意义[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2018, 8(4): 193-198.
- [15] 文艺, 董玉斌. 先天性巨结肠术后并发肠炎危险因素逻辑回归分析[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(1): 130.
- [16] 黄露, 刘远梅. 先天性巨结肠相关信号通路研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(12): 957-959.
- [17] CHAEYOUN O H, JOONG K E E, YOUN J W, et al. The patients with Hirschsprung's disease who underwent pull-through at age less than 1 year: longitudinal bowel function[J]. World Journal of Surgery, 2020, 44(7): 2426-2439.
- [18] XIN Y, MENG J, WANG T Q, et al. Long-term outcomes of single-incision laparoscopic technique in soave procedure compared with heart-shaped anastomosis for Hirschsprung disease[J]. International Journal of Colorectal Disease, 2020, 35(6): 1049-1054.
- [19] LI H, WU P, XIAO Q I, et al. Altered expression of AKT1 and P38A in the colons of patients with Hirschsprung's disease[J]. Pediatric Surgery International, 2020, 36(6): 719-725.
- [20] 郑辉明, 向磊, 李宁, 等. SOX-10 在先天性巨结肠相关性小肠结肠炎发病中的作用[J]. 中华小儿外科杂志, 2011, 32(2): 93-97.
- [21] STOLT C C, WEGNER M. SoxE function in vertebrate nervous system development[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(3): 437-440.
- [22] 施诚仁. 再谈先天性巨结肠小肠结肠炎的防治[J]. 临床小儿外科杂志, 2019, 18(5): 348-351.
- [23] 沈涤华, 施诚仁, 吴晔明, 等. 先天性巨结肠患儿肠道内 Smoothelin 的表达[J]. 中华小儿外科杂志, 2017, 38(4): 288-291.
- [24] SANCHEZ-MEJIAS A, WATANABE Y, MFEMDNDEZ R. et al. Involvement of SOX-10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient[J]. J Mol Med, 2010, 88(5): 507-514.
- [25] 胡晓丽, 詹江华, 王学文. 先天性巨结肠神经胶质衍化亲神经营养因子的免疫组织化学观察[J]. 中华病理学杂志, 2002, 31(1): 56-57.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 庞文帅, 马建苏, 刘晓丽, 等. 先天性巨结肠患儿不同肠管中 SOX-2、SOX-10、GDNF 的表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(19): 14-18.

Cite this article as: PANG W S, MA J S, LIU X L, et al. Expression and significance of SOX-2, SOX-10 and GDNF in different intestines of children with congenital megacolon[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(19): 14-18.