

论著 · 临床研究

Wnt5a 在肛门直肠畸形患儿末端直肠组织中的表达及意义

贾慧敏 陈青江 张涛 白玉作 王维林

(中国医科大学附属盛京医院小儿外科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 通过检测 Wnt5a 在肛门直肠畸形 (ARM) 患者末端直肠壁的表达, 探讨其与 ARM 之间的可能关系。**方法** 应用免疫组化和 Western blot 方法检测 20 例 ARM 患儿、7 例后天性肠痿和 6 例非胃肠道疾病患儿 (对照组) 末端直肠壁 Wnt5a 的表达并对比分析。**结果** 对照组 Wnt5a 表达于直肠壁内肌间神经丛、黏膜层及黏膜下层, ARM 组的末端直肠壁内 Wnt5a 表达较对照组减少, 尤其高位畸形组减少更为明显。Western blot 蛋白印迹结果: ARM 高位组、中位组和低位组 Wnt5a 蛋白表达均明显低于对照组和后天肠痿组 ($P < 0.01$)。高位组和中位组 Wnt5a 蛋白表达明显低于低位组 ($P < 0.01$)。后天肠痿组与对照组比较差异无统计学意义。**结论** Wnt5a 在 ARM 末端直肠的表达水平减低, 可能与 ARM 的发生密切相关。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(6): 495-498]

[关键词] Wnt5a; 肛门直肠畸形; 儿童
[中图分类号] R726 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)06-0495-04

Expression of Wnt5a in the terminal rectum of children with anorectal malformation

JIA Hui-Min, CHEN Qing-Jiang, ZHANG Tao, BAI Yu-Zuo, WANG Wei-Lin. Department of Pediatric Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Wang W-L, Email: wangwl@sj-hospital.org)

Abstract: Objective To study the expression of Wnt5a protein in the terminal rectum of children with anorectal malformation (ARM) and the possible association between Wnt5a and ARM. **Methods** Specimens were obtained from 20 children with ARM, 7 children with acquired rectovestibular fistula and 6 children with non-gastrointestinal tract disease (control group). The expression of Wnt5a protein in the terminal rectum was determined by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Wnt5a was mainly expressed in the rectum of the myenteric nerve plexus, mucosal layer and submucosa in the control group. Compared with the control group, Wnt5a expression in the terminal rectum decreased significantly in the ARM group, and decreased more significantly in children with high ARM. The results of Western blot showed the expression of Wnt5a protein in the high, intermediate and low ARM groups were significantly lower than that in the acquired rectovestibular fistula and the control groups ($P < 0.01$). The expression of Wnt5a protein in the high and the intermediate ARM groups were also lower than that in the low ARM group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the Wnt5a protein expression between the acquired rectovestibular fistula and the control groups. **Conclusions** The expression of Wnt5a in the terminal rectum decreases in children with ARM, suggesting Wnt5a may play an important role in the development of ARM. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(6): 495-498]

Key words: Wnt5a; Anorectal malformation; Child

肛门直肠畸形 (anorectal malformation, ARM) 是常见的小儿消化道畸形之一, 其疾病谱很广, 包括从单纯的肛门狭窄到复杂的泄殖腔畸形等, 并且常合并盆底肌发育不良、骶骨缺如、盆底肌神经支配异常及脊髓异常等^[1-2]。目前认为 ARM 的发生是多因素的, 但具体发育过程及畸形演变规律仍不清楚。文献报道 Wnt5a 为 Wnt 信号家族中的重要成员, 在

控制肠管发育中起重要作用^[3]。研究显示, Wnt 信号至少存在下列路径: 经典的 Wnt/ β -catenin 通路、非经典的 Wnt 通路、Wnt/ Ca^{2+} 和 Wnt/PCP 等途径, 而 Wnt5a 被认为是非经典路径的典型代表^[4]。Wnt5a^{-/-}突变鼠表现出严重的肠管发育障碍, 并伴发肛门闭锁^[5]。目前关于 ARM 患儿直肠末端 Wnt5a 蛋白的表达及分布的研究国内外未见报道, 故本研

[收稿日期] 2010-10-08; [修回日期] 2010-11-17
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (项目批准号: 30801199); 辽宁省科技攻关计划 (2007225005-3); 辽宁省教育厅重点实验室项目 (LS2010171)。
[作者简介] 贾慧敏, 女, 博士, 副教授。
[通信作者] 王维林, 教授。

究应用免疫组织化学法和 Western blot 蛋白定量分析方法对 ARM 患儿直肠末端组织中的 Wnt5a 的表达进行定位和定量研究,以探讨 ARM 与 Wnt5a 表达之间的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集我院 2007 ~ 2009 年 20 例 ARM 患儿直肠末端标本,男 14 例,女 6 例,平均年龄 8.5 月,其中高位畸形 5 例,中位畸形 7 例,低位畸形 8 例。正常对照为 7 例死于非胃肠道疾病患儿的直肠末端标本,男 5 例,女 2 例,平均年龄 7.3 月。另取 6 例后天肠痿患儿的直肠末端组织为另一对照组。标本取得后放入经 DEPC 处理的无菌 EP 管中,立即置于液氮中速冻后置于 -80℃ 冰箱中保存。标本获取均取得监护人书面授权并获得医院伦理委员会认可。

1.2 试剂

Wnt5a 多克隆抗体 (CATALOG: sc-30224); UltraSensitive™ SP 超敏试剂盒 (产品编号: kit-9706)、多聚赖氨酸、DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组化检测肠组织 Wnt5a 蛋白表达

肠壁组织经 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,进行免疫组化染色,一抗为 1: 200 山羊抗人 Wnt5a 抗体,4℃ 孵育 14 h,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,DAB 显色。经苏木素复染,脱水、透明后封片。PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性片作为阳性对照。胞质中出现棕黄色颗粒者为阳性,观察阳性细胞出现的部位和分布,经显微摄像扫描后 (Nikon E800, 日本),将图像输入计算机。每张切片

选取 3 个视野,采用计算机图像分析软件 (NIS-elementsbasic research) 计算分析单位面积内累积光密度值 (integrated optical density, IOD)。

1.4 Western blot 检测肠组织 Wnt5a 蛋白表达

取直肠末端全层肠组织约 100 mg,经破碎、匀浆后低温离心,提取总蛋白。各取 50 μL 蛋白定量,其含量按改良 Lowry 法测定,以浓度最低管为基准,调节蛋白浓度,于 -20℃ 冻存备测。经电泳转印等步骤后,用 GIS-2020 凝胶图象分析系统扫描分析结果。对蛋白质含量进行密度分析,以相对灰度值代表蛋白表达量。相对灰度值 = Wnt5a 蛋白的灰度值/该组 β-actin 的灰度值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wnt5a 在各组末端直肠的形态学表达特点

Wnt5a 的阳性表达为胞浆内棕黄色颗粒。本研究发现,在正常对照组 Wnt5a 主要表达于直肠壁肌间神经丛和黏膜下层的神经节细胞胞浆内,另外在肠壁黏膜层和黏膜下层也有少许表达,其中肌间神经丛神经节处表达最强 (图 1A)。畸形组的末端直肠壁表达的阳性表达细胞根据不同类型的畸形而存在不同程度的差异,低位畸形组末端直肠肌间仍可见阳性细胞,较正常对照组略减少,表达稍弱 (图 1B),但中/高位畸形患儿末端直肠内却未见明显阳性细胞存在 (图 1C)。不同组别 Wnt5a 表达的 IOD 值比较见表 1。

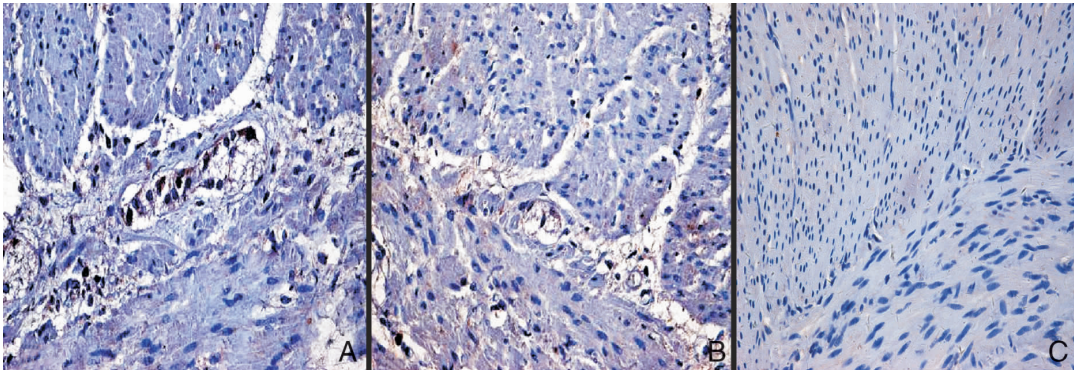


图 1 末端直肠中 Wnt5a 的表达 (免疫组化, ×400) A: 正常对照组, 可见在肌间神经节细胞胞浆内大量 Wnt5a 阳性表达; B: 低位 ARM 组, 可见阳性表达的细胞, 表达强度较正常组稍弱; C: 高位 ARM 组, 无 Wnt5a 阳性细胞表达。Wnt5a 阳性表达为胞浆内棕黄色颗粒。

2.2 Wnt5a 蛋白在各组末端直肠的表达

Western blot 显示,ARM 高位组、中位组和低位组蛋白表达水平均明显低于正常对照组和后天痿组($F = 15.44, P < 0.01$);而且高位组和中位组明显低于低位组($P < 0.01$);后天痿组与正常对照组比较差异无统计学意义($P = 0.63$)。见表1,图2。

表1 各组免疫组化测定的 Wnt5a 表达的 IOD 值及 Wnt5a 蛋白定量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Wnt5a IOD	Wnt5a 蛋白
正常对照组	7	82 ± 20	0.72 ± 0.03
后天肠痿组	6	77 ± 18	0.63 ± 0.05
低位畸形组	8	61 ± 14 ^{a,b}	0.30 ± 0.04 ^{a,b}
中位畸形组	7	31 ± 10 ^{a,b,c}	0.23 ± 0.04 ^{a,b,c}
高位畸形组	5	15 ± 6 ^{a,b,c}	0.19 ± 0.05 ^{a,b,c}
F 值		24.85	15.44
P 值		<0.01	<0.01

a: 与正常对照组比较, $P < 0.01$; b: 与后天肠痿组比较, $P < 0.01$; c: 与低位畸形组比较, $P < 0.01$

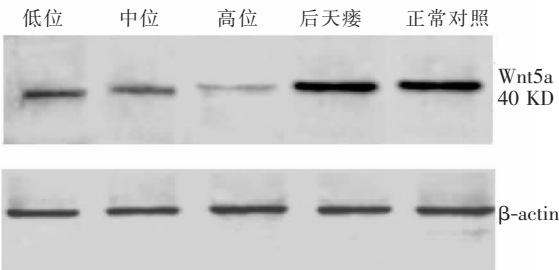


图2 Wnt5a 蛋白在各组直肠末端的表达 高位畸形组、中位畸形组 and 低位畸形组蛋白表达水平均明显低于后天痿组和正常对照组。

3 讨论

ARM 的疾病谱较广泛,不仅肛门直肠本身发育缺陷,盆腔肌肉神经亦发育异常。另外 ARM 不仅可以独立存在,还常常合并其他畸形。目前认为 ARM 的发生是胚胎期尿直肠隔与泄殖腔膜持续存在所致。Bai 等^[6]的研究提示 ARM 的发生是胚胎期直肠发育发生障碍的结果;张海兰等^[7]发现在泄殖腔的胚胎发育过程中,尿直肠隔间质、直肠背侧间质和泄殖腔膜细胞凋亡的异常是导致 ARM 的原因之一。由于 ARM 的病理改变十分复杂,因而其发生机制至今仍不清楚。

Wnt5a 基因定位于染色体 3p14 ~ p21,目前对 Wnt5a 的研究主要涉及肿瘤方面^[8],而且主要集中在

于 Wnt5a 基因在肿瘤转录和翻译水平的变化。既往研究证实 Wnt5a 在器官发生的过程中,对于上皮细胞增殖迁移,细胞黏附及神经干细胞的增殖分化等方面都起着重要的调节作用^[9],Wnt5a 蛋白主要通过自分泌和旁分泌途径产生,起细胞间的相互联系作用,对于调控生物体肛门直肠正常发育有非常重要的意义^[10]。最近国外学者在小鼠胚胎发育中研究认为 Wnt5a 基因在小鼠肠道延长发育过程中起着重要作用,Wnt5a^{-/-}突变鼠的肠道明显较野生型短小,而且发育差,另外后肠也存在发育异常,而且伴发肛门闭锁^[11]。本课题组的前期研究也发现了 Wnt5a 在正常 Wistar 大鼠和 ETU 致畸 ARM 大鼠的末端直肠肠壁的发育过程中的表达存在差异^[12]。本研究进一步在形态学上对无胃肠道疾病患儿和 ARM 患儿直肠末端组织中的 Wnt5a 的表达进行研究,发现在正常对照组直肠末端的肌间神经丛、直肠黏膜及黏膜下层处 Wnt5a 阳性细胞较多,而 ARM 组直肠末端 Wnt5a 阳性细胞减少或消失;另外高位组、中位组和低位组蛋白表达水平均明显低于正常对照组。而且高位和中位 ARM 患儿 Wnt5a 蛋白表达明显低于低位组。考虑在 ARM 发生过程中,如果 Wnt5a 信号降低,可能影响了肠管正常胚胎发育过程中的信号传导,从而不同程度地影响了末端直肠的发育,进而产生了 ARM。本研究发现畸形位置愈高,Wnt5a 分子表达愈弱,推测 Wnt5a 信号降低的程度不同,影响肠管发育的程度也不同,从而产生不同的畸形类型。另一方面,Wnt5a 在末端直肠壁内肌间神经节处表达较强,推测这一信号分子可能通过调节神经干细胞的增殖分化从而调节肠壁神经系统的发育,进而对肠道的功能产生影响。

目前研究认为 ARM 是多因素疾病,同时受到多种环境因素的影响,对其相关因子的研究主要集中在 shh、BMP4、Hox、FGF、EphB2 及 Wnt 这些形态发生因子上^[13]。上述基因以系统协调的网络框架的形式参与肛门直肠的正常发育,任何一个微细的环节的差错就可能会影响该系统整体功能的发挥,致使畸形出现。Wnt5a 是这个网络的重要一环,本研究结果提示:Wnt5a 表达水平减低与 ARM 的发生有关,Wnt5a 在先天性 ARM 的发生中可能具有重要作用。

今后我们还将围绕 Wnt5a 及其信号通路的相关基因进行联合研究,克服单一基因研究的缺陷,进一步明确基因间的交互作用和基因与表型的相互关系,进而对疾病的认识有深入的提高。

[参 考 文 献]

[1] Mandhan P, Qi BQ, Beasley SW. Aberrations of the intrinsic innervation of the anorectum in fetal rats with anorectal malformations [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(2): 397-402.

[2] Li L, Li Z, Wang LY, Xiao FD. Anorectal anomaly: neuropathological changes in the sacral spinal cord [J]. J Pediatr Surg, 1993, 28(7): 880-885.

[3] Cervantes S, Yamaguchi TP, Hebrok M. Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice [J]. Dev Biol, 2009, 326(2):285-294.

[4] Cha SW, Tadjuidje E, Tao Q, Wylie C, Heasman J. Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in Xenopus axis formation [J]. Development, 2008, 135(22):3719-3729.

[5] Lickert H, Kispert A, Kutsch S, Kemler R. Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development [J]. Mech Dev, 2001, 105(1-2): 181-184.

[6] Bai YZ, Chen H, Yuan ZW, Wang WL. Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in rats [J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(4): 587-590.

[7] 张海兰,白玉作,张志波,王伟,王维林. 肛门直肠畸形大鼠泄殖腔胚胎发育过程中细胞凋亡的研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(9):709-713.

[8] Ying J, Li H, Yu J, Ng KM, Poon FF, Wong SC, et al. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(1): 55-61.

[9] Moon RT, Brown JD, Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development [J]. Trends Genet, 1997, 13(4):157-162.

[10] Theodosiou NA, Tabin CJ. Wnt signaling during development of the gastrointestinal tract [J]. Dev Biol, 2003, 259(2):258-271.

[11] Tai CC, Sala FG, Ford HR, Wang KS, Li C, Minoo P, et al. Wnt5a knock-out mouse as a new model of anorectal malformation [J]. J Surg Res, 2009, 156(2):278-282.

[12] 贾慧敏,张海兰,陈青江,张涛,王维林. Wnt5a 及 Frizzled-1 基因在肛门直肠畸形大鼠直肠发育过程中的表达及意义 [J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 31(9): 689-693.

[13] Mandhan P, Quan QB, Beasley S, Sullivan M. Sonic hedgehog, BMP4, and Hox genes in the development of anorectal malformations in Ethylenethiourea-exposed fetal rats [J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(12): 2041-2045.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

2011 年新生儿治疗矛盾与对策学习班通知

广州市医学会新生儿科分会、广州市妇女儿童医疗中心(广州市儿童医院)和广州市花都区胡忠医院拟于 2011 年 8 月 17~21 日在广州市花都联合举办新生儿治疗矛盾与对策学习班,为期 4 天。本项目系国家级继续教育项目(2011-06-03-048),学习结束授予 I 类学分 10 分。

本项目主要探讨新生儿常见病和危重症治疗中的各种矛盾,从矛盾的认定,矛盾的机制和处理等方面阐明疾病治疗的合理性和全局性,从而更好地进行治疗,避免医源性损伤。将邀请复旦大学儿科医院、上海交通大学新华医院/附属儿童医院、浙江大学附属儿童医院、中南大学湘雅医院、中山大学附一院/附六院、暨南大学医学院附一院、南方医科大学、广州医学院、广州市妇女儿童医疗中心(广州市儿童医院)等单位的专家、教授授课。

报名办法:学费(含资料费)800 元,食宿统一安排,费用自理。有意参加者请来信、电话或电子邮件联系,并注明联系方式以便发送第二轮通知。主办方联系地址:(1)广州市人民中路 318 号 广州市儿童医院新生儿科,邮编 510120;联系电话:020-81330578;13928737378(联系人:周伟,E-mail:zhouwei_pu002@163.com)(2)广州市花都区新华街工业大道 17 号 广州市花都区妇幼保健院(胡忠医院产科院区)新生儿科,邮编 510800;联系电话:13926263850(联系人:瞿柳红,E-mail:quliuhong@126.com)。亦可从广州市妇女儿童医疗中心网站查询和下载相关资料。